

**Immunologische Parameter
bei Patienten mit chronischer
Polyarthrit (c.P.) und
und Sjögren-Syndrom**

Manfred Riester

Diss. München

1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554813_0034

Aus der Medizinischen Klinik III
Klinikum Großhadern
Direktor: Professor Dr. W. Wilmanns

und der Medizinischen Poliklinik
Direktor: Professor Dr. N. Zöllner

Ludwig-Maximilians-Universität
München

Immunologische Parameter bei Patienten
mit
chronischer Polyarthritits (c.P.)
und
Sjögren-Syndrom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Manfred Riester
aus
Lindenberg
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. W. Mempel
Mitberichterstatter: Professor Dr. W. Wilmanns
Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.3.1985

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	S. 1
1.1.	Chronische Polyarthrititis	S. 1
1.1.1.	Allgemeines	S. 3
1.1.2.	Chronische Polyarthrititis mit Sjögren-Syndrom	S. 6
1.1.3.	Immunologische Veränderungen bei chronischer Polyarthrititis	S. 11
1.2.	Ziele der vorliegenden Untersuchung	S. 20
2.	Material und Methode	S. 21
2.1.	Probanden	S. 21
2.2.	HLA-System	S. 22
2.2.1.	Allgemeines	S. 22
2.2.2.	Verwendete Reagenzien	S. 24
2.2.3.	Technik	S. 24
2.3.	Lymphozytenkinetik	S. 27
2.3.1.	Allgemeines	S. 27
2.3.2.	Verwendete Reagenzien	S. 30
2.3.3.	Gewinnung der Lymphozyten	S. 33
2.3.4.	Kulturverfahren	S. 35
2.3.4.1.	Mitogen- und Antigenkulturen	S. 35
2.3.4.2.	Suppressorzellansatz	S. 36

2.3.5.	Markierungsverfahren	S. 39
2.3.6.	Ernte- und Szintillationverfahren	S. 39
2.4.	Statistische Methoden	S. 40
3.	Ergebnisse	S. 42
3.1.	Chronische Polyarthrititis Gesamtkollektiv	S. 42
3.2.	Chronische Polyarthrititis mit Sjögren-Syndrom	S. 47
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	S. 51
4.	Diskussion	S. 68
5.	Zusammenfassung	S. 74
6.	Literaturverzeichnis	S. 76

1. EINLEITUNG

1.1. Chronische Polyarthritits

Der Begriff "Rheuma" stammt aus dem Altgriechischen und bedeutet "Fließen". Charakterisiert werden auch heute noch die Gelenkbeschwerden des rheumatischen Fiebers mit "fließend", von einem Gelenk zum anderen springend. Zum Sammelbegriff Rheuma werden nun Erkrankungen des Bindegewebes und schmerzhaftige Störungen des Bewegungsapparates gezählt, die sämtlich potentiell zur Ausbildung chronischer Symptome führen können (218). Darunter fallen:

- entzündlicher Rheumatismus mit rheumatischem Fieber, chronische Polyarthritits einschließlich Still-, Felty- und Sjögren-Syndrom, Morbus Reiter, Arthritis psoriatica, Spondylarthritits ankylopoetica
- degenerativer Rheumatismus
- extraartikulärer Rheumatismus mit Muskelrheuma, Pannikultitis, Bursitis, Tendovaginitis, Periarthritits u. a. mehr.

Diese Einteilung berücksichtigt nicht die Ätiologie der rheumatischen Erkrankungen und es handelt sich nicht um nosologische Einheiten, die zusammengefaßt bzw. unterschieden werden.

Unter allen Erkrankungen nun verursacht der rheumatische Formenkreis bei weitem die höchsten Kosten.

Nach Zahlen der Deutschen Rheumaliga (113) wurden 1976 für die medizinische Versorgung ca. 7 Milliarden DM ausgegeben, die indirekten Kosten für Arbeitsunfähigkeitstage und Frühinvalidität lagen bei etwa 30 Milliarden DM. Die Zahl der von den Rentenversicherungsträgern für diese Krankheiten durchgeführten Heilverfahren lag noch vor denen für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und Diabetes durchgeführten bei einem Anteil von 31,3% an allen stationären Heilbehandlungen (218). Etwa eine Million Menschen in der Bundesrepublik leiden an einem entzündlichen Rheuma und bedürfen der ständigen Behandlung und Überwachung. Soweit zur sozialmedizinischen Bedeutung der rheumatischen Erkrankungen.

Die chronische Polyarthrititis kommt unabhängig von geographischen Faktoren (12) bei ca. 0,5% - 3,8% der Bevölkerung vor, je nachdem, ob mit den ersten fünf Kriterien der American Rheumatism Association (ARA) - Morgensteifigkeit; Bewegungsschmerz oder Druckdolenzen mindestens in einem Gelenk; Schwellung in mindestens einem Gelenk; Schwellung in mindestens einem weiteren Gelenk; symmetrische Schwellung von Gelenken mit gleichzeitiger Beteiligung der gleichen Gelenke auf beiden Körperseiten (178) - nur das aktive Krankheitsbild oder mit den klinischen New York-Kriterien (NY) - Anamnese von mindestens drei schmerzhaften Gelenken oder Gelenkgruppen der Gliedmaßen; Schwellung, Bewegungseinschränkung, Subluxation und/oder Ankylose mindestens dreier Gelenke; röntgenologische Veränderungen (Erosionen); positiver Rheumafaktor (15) - auch inaktive Verlaufsformen berücksichtigt werden.

Der Altersgipfel liegt bei ca. 40 Jahren (5), der Beginn der Erkrankung liegt bei 70% der Patienten im dritten bis siebten Lebensjahrzehnt (91). Frauen erkranken etwa zwei- bis viermal häufiger als Männer (5, 12, 91), allerdings verwischt sich der Unterschied mit zunehmendem Alter. Familienuntersuchungen ergaben ein geringfügig häufigeres Vorkommen der c.P. bei Verwandten ersten Grades (65).

1.1.1. Allgemeines

Die Krankheit beginnt in der Regel schleichend. Ein oft jahrelanges Prodromalstadium geht ihr voraus. In etwa 25% der Fälle beginnt sie akut mit Fieber und plötzlichen Gelenkergüssen (101). Bei der Sektion findet man ein gefäßreiches, stark proliferierendes Granulationsgewebe, das meist vom Stratum synoviale im Bereich des Gelenkrezessus ausgeht und zentripetal in die angrenzenden Gelenkstrukturen einwächst - den Pannus. Dieser Pannus kann Gelenkknorpel und den subkartilaginären Knochen zerstören, aber auch Stratum fibrosum, Bänder und Sehnen durchwachsen; häufiges Endstadium ist die fibröse Ankylose (56, 87). Die Stellungsanomalien lassen sich aus der Pathophysiologie des Muskel-Sehnen-Apparates erklären. Weitere Befunde bei etwa der Hälfte der schweren und länger dauernden Fälle sind eine Arteriitis von Herz, Muskeln, seltener der Vasa nervorum, und eine periphere obliterierende Endarteriitis mit Gefäßverschlüssen (34).

Manifestationen der Krankheit sind außerdem an Augen, Lunge und Leber zu finden (5). Oft kompliziert eine sekundäre Amyloidose oder das gemeinsame Auftreten von c.P. mit einer Kollagenose wie Lupus erythematoses das Bild (5, 56). Erst in den letzten Jahren wurde die Bedeutung von Struktur und Funktion des Stratum synoviale für Gelenkerkrankungen erkannt. Beim Gesunden wird es zur Gelenkhöhle hin von zwei Arten von Synovialiszellen begrenzt: Typ A-Zellen sind zwar keine klassischen Makrophagen, da ihnen der Komplementrezeptor fehlt (216), ihrer Struktur nach jedoch Phagozyten. Typ B-Zellen stammen von Fibroblasten ab (142), ihre Aufgabe ist die Synthese von Mukopolysacchariden. Vom darunterliegenden gefäßreichen Bindegewebe sind die Synovialisdeckzellen nicht durch eine Basalmembran getrennt. Die Synovia enthält ein Ultrafiltrat des Blutplasmas, außerdem Hyaluronsäure, die von den B-Zellen sezerniert wird. Daneben kommen Zellen in einer Konzentration von $200/\text{mm}^3$ vor, 7% Granulozyten, 64% Monozyten, 25% Lymphozyten und 4% Synovialiszellen.

Beim Erkrankten nun führen je nach Aktivität und Stadium des Prozesses exsudative und proliferative Veränderungen zu folgenden Befunden (4, 102): A- und B-Zellen sind vermehrt, die Synovialiszellschicht ist verbreitert (125), beide Zelltypen zeigen Zeichen erhöhter Aktivität, wie Mehrkernigkeit (98) und Zellbrücken. Sogenannte "Reiskörperchen" in der Synovia entstehen durch Abtrennung hyperplastischer Mikrovilli der Synovialis.

Das Kollagen weist weniger alkalistabile Quervernetzungen auf (206). Die Proliferation und Transformation der Bindegewebszellen im Stratum synoviale führt zu einem Gewebe, das Ähnlichkeit mit einem mesenchymalen Bindegewebe hat. Als Zeichen der Exsudation kommt es zu einem vermehrten Einstrom von großmolekularen Plasmabestandteilen und zu fibrinoiden Nekrosen der Synovialiszellschicht, als Zeichen eines veränderten Stoffwechsels ist der Gehalt an O_2 und Glucose erniedrigt, Lactat und CO_2 erhöht, der pH-Wert fällt ab (40). Die Synovialiszellen bilden weniger Glykosaminoglykanproteide und eine niedriger polymerisierte Hyaluronsäure (41). Die Synovia des Polyarthritikers ist vermehrt, doch weniger viskös, das Verhältnis von Hyaluronsäure zu Protein sinkt von 50 : 1 auf 10 : 1 (200), pathologische Hyaluronat-Protein-Komplexe sind auffallend (188). Serologisch lassen sich Befunde erheben, die darauf hinweisen, daß die c.P. eine Allgemeinerkrankung ist (5): Bei der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit sind Werte zwischen 40 und 80 mm nach der ersten Stunde typisch, was u.a. durch die Vermehrung des Fibrinogenes, der α_2 -, β -, γ -Globuline und die Verminderung der Albumine bedingt ist. Weiter sinkt der Serumeisengehalt, es kann sich eine normo- bis hypochrome Anämie entwickeln, während das Serumkupfer ansteigt.

Da die genaue Ursache all dieser Veränderungen noch weitgehend im Dunkeln liegt, greift eine Therapie bisher nur symptomatisch:

Vom Chirurgen werden die zerstörten Knochen durch Prothesen ersetzt, Sehnenansätze verlegt, Bänder wiederhergestellt, die erkrankte Synovialis entfernt. In der Inneren Medizin (5) kommen Antirheumatika und Corticoide zum Einsatz, die analgetisch, antiphlogistisch und antipyretisch wirken. Bei den sogenannten Basistherapeutika handelt es sich um Chloroquin-Derivate, Goldverbindungen und D-Penicillamin, deren Wirkmechanismus größtenteils noch ungeklärt ist. Die Behandlung mit Immunsuppressiva bleibt nach anfangs hoffnungsvollen Erfolgen wenigen Fällen, malignen und lupoiden Verlaufsformen, vorbehalten. Und schließlich seien noch die medizinische Strahlentherapie und die physikalische Therapie, die eine große Rolle in der Rehabilitation spielt, erwähnt.

1.1.2. Chronische Polyarthrititis mit Sjögren-Syndrom

Das Sjögren-Syndrom ist eine Autoimmunkrankheit, die durch lymphozytäre und plasmazelluläre Infiltration der exokrinen Drüsen charakterisiert ist (163). Das Sjögren-Syndrom kommt entweder allein vor, oder es ist mit einer anderen Autoimmunkrankheit vergesellschaftet. Dazu gehören: Chronische Polyarthrititis, systemischer Lupus erythematoses, Polymyositis, Sklerodermie, Panarteriitis, Thyreoiditis Hashimoto, chronische hepatobiliäre Erkrankungen, Purpura hyperglobulinaemica, Lungenfibrose, Makroglobulinämie und Lymphome (191).

Nach einem Vorschlag von Moutsopoulos sollte die Bezeichnung "Primäres Sjögren-Syndrom" für den allein vorkommenden Symptomenkomplex verwendet werden, wohingegen der Terminus "Sekundäres Sjögren-Syndrom" den Fällen zugeordnet werden sollte, in denen eine Kombination des Sjögren-Syndroms mit einer der oben genannten Autoimmunkrankheiten vorliegt (144).

1930 beobachtete der schwedische Ophtalmologe Henrik Sjögren den ersten Fall einer Keratoconjunctivitis sicca, und bereits drei Jahre später veröffentlichte er Untersuchungen über dieses Krankheitsbild, wobei er zu folgenden Ergebnissen kam: Die Keratoconjunctivitis sicca befallt vorwiegend Frauen während der Menopause und ist eine lokale Erscheinung eines generalisierten Symptomenkomplexes (193). Heute wissen wir, daß zum voll ausgebildeten Sjögren-Syndrom folgende Manifestationen gehören: Trockenheit der Augen, der Nase, des Mundes, des Pharynx, der Trachea, der Vagina und des Magens sowie eine Schwellung der Speichel- und gelegentlich auch der Tränendrüsen. Systemische Manifestationen - unabhängig von der begleitenden rheumatischen Erkrankung - kommen vor: Trockenheit der Haut, Vaskulitis, Raynaud-Phänomen, Dysphagien, Pankreatitis, chronische hepatobiliäre Erkrankungen (z.B. primäre biliäre Zirrhose), interstitielle Pneumonie und diffuse interstitielle Lungenfibrose, Perikarditis, interstitielle Nephritis, Neuropathien und Schilddrüsenbefall (191).

Das histologische Bild der befallenen exokrinen Drüsen ist charakterisiert durch Atrophie des Drüsenparenchyms, massive Rundzellinfiltrationen und Ablagerung von Bindegewebe (193). Interessanterweise hat dieses histologische Bild große Ähnlichkeit mit dem einer von Thyreoiditis Hashimoto (Struma lymphomatosa) befallenen Schilddrüse.

Häufig beginnt das Sjögren-Syndrom mit nur einem Symptom, das über lange Zeit als einziges manifest ist und daher die Diagnose erschwert. Deshalb gibt es Kriterien, die die Diagnose Sjögren-Syndrom sichern oder zumindest wahrscheinlich machen (191): Die Diagnose Sjögren-Syndrom ist gesichert bei entweder objektivem Nachweis einer Kera-toconjunctivitis sicca oder charakteristischen pathologischen Merkmalen der Tränen- oder Speicheldrüsen. Sind zwei der folgenden drei Merkmale - rezidivierende oder chronische "idiopathische" Speicheldrüsenschwellungen, unerklärbare Xerostomie, Vorhandensein einer Kollagenose - bei einem Patienten vorhanden, so gilt die Diagnose Sjögren-Syndrom als wahrscheinlich.

Über die Häufigkeit des Vorkommens des Sjögren-Syndroms gibt es unterschiedliche Angaben, je nach Art des untersuchten Kollektivs. In der vorliegenden Arbeit ist hauptsächlich das Vorkommen des Sjögren-Syndroms bei Patienten mit c.P. von Interesse.

Holm (109) beobachtete bei 14,2% und Thompson und Eadie (213) bei 14,3% von Polyarthritikern eine Keratoconjunctivitis sicca, und andere Autoren kommen zu ähnlichen Ergebnissen (205). In unserer Studie hatten wir 33 Sicca-Patienten unter 234 Polyarthritikern, was einer Rate von 14,1% entspricht.

Die ersten Symptome des Sjögren-Syndroms treten bei den meisten Patienten - in Übereinstimmung der meisten Autoren - im Alter von 40 bis 60 Jahren auf. Bloch (21) beschrieb, daß der Krankheitsbeginn bei Patienten mit Sjögren-Syndrom und begleitender c.P. sowie bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom fast identisch ist; im ersten Fall im Alter von durchschnittlich 49, im zweiten Fall im Alter von durchschnittlich 52 Jahren.

Frauen werden bevorzugt befallen. Sjögren selbst beobachtete, daß 96% seiner beschriebenen Fälle weiblichen Geschlechts waren (194). Die meisten Autoren berichten von einer Befallsrate des weiblichen Geschlechts von ungefähr 90%. Interessant ist, daß das Verhältnis Frauen : Männer bei der c.P. 3 : 1 beträgt, beim Sjögren-Syndrom sogar bis auf 9 : 1 ansteigt (191).

Wie oben erwähnt leiden etwa 14% der Polyarthritiker zusätzlich an Sjögren-Syndrom.

Umgekehrt beobachtete Sjögren bei 68% seiner Patienten mit Keratoconjunctivitis sicca arthritische Beschwerden (193), jedoch kann man davon ausgehen, daß nicht alle diese Patienten die Kriterien für c.P. der American Rheumatism Association erfüllt hätten. Nach Einführung dieser Kriterien diagnostizierten Denko und Bergensthal (69) bei 50%, die National Institutes of Health (21) bei 52% und die Michigan-Studie (221) bei 57% ihrer Sicca-Patienten zusätzlich c.P.. Bei Patienten mit diesem kombinierten Krankheitsbild treten systemische Manifestationen und serologische Merkmale im Allgemeinen häufiger auf als bei Patienten, die an c.P. allein leiden (191).

Ein bemerkenswerter Aspekt bei der Betrachtung des Sjögren-Syndroms ist das Vorhandensein von immunologischen Veränderungen, die nicht durch eine begleitenden Autoimmunkrankheit bedingt sind, sondern auch bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom gefunden werden. Dazu gehören Antigammaglobulin-Antikörper, Antinukleäre Antikörper (11, 17, 22, 82, 131), Hypergammaglobulinämie (21, 115, 133, 191, 221), positiver Rheumafaktor (17, 58, 82, 191, 221), LE-Zellphänomen (21, 105, 191, 221), falsch positive Reaktionen beim VDRL-Rest auf Lues (21, 191) sowie organspezifische Antikörper gegen Speicheldrüsen (18, 22, 82, 115, 131), Tränendrüsen (115), Schilddrüse (7, 22, 104), glatte Muskulatur (191) und Mitochondrien (191).

Ferner wurden Veränderungen der zellulären Immunität gefunden, und zwar im Sinne einer Schwächung der zellulären Immunität, die in ihrer Art an M. Hodgkin, Sarkoidose und chronische lymphatische Leukämie erinnert (191).

Hämatologische Befunde sind erhöhte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (17, 21, 58, 105, 191), normo- oder hypochrome Anämie (22, 208, 221), Leukopenie (191, 208, 221) und Eosinophilie (24, 109, 191, 208).

1.1.3. Immunologische Veränderungen bei chronischer Polyarthritis

Heute besteht kein Zweifel mehr, daß es sich bei der c. P. um eine Erkrankung handelt, die unter wesentlicher Beteiligung des Immunsystems abläuft.

Ätiologische Theorien gehen von drei Voraussetzungen aus: Von einer genetischen Prädisposition des Organismus, einer krankhaften Immunantwort und einer Startreaktion. Diese drei Theorien scheinen nicht isoliert Gültigkeit zu haben, sondern alle drei tragen zu einer in komplexer Art und Weise entstehenden Krankheit bei. Wahrscheinlich ist auch die c.P. selbst keine nosologische Entität, sondern es kommen verschiedene Ursachen in Betracht und somit vielleicht unterschiedliche Mechanismen der Krankheitsentstehung, die alle gemeinsam in das Bild einer entzündlichen Gelenkerkrankung, der c.P., münden.

Unter diesen Umständen und unter Berücksichtigung der Vielzahl von dokumentierten Veränderungen, die in einem dichten Netz miteinander verknüpft sind, einander bedingen, scheint das Mittel der Sprache mitunter ungeeignet, auch nur grobe Zusammenhänge darzustellen. Deshalb sei an dieser Stelle die graphische Synopse der vermutlichen Pathogenese der c.P. nach Müller (5) dargestellt:

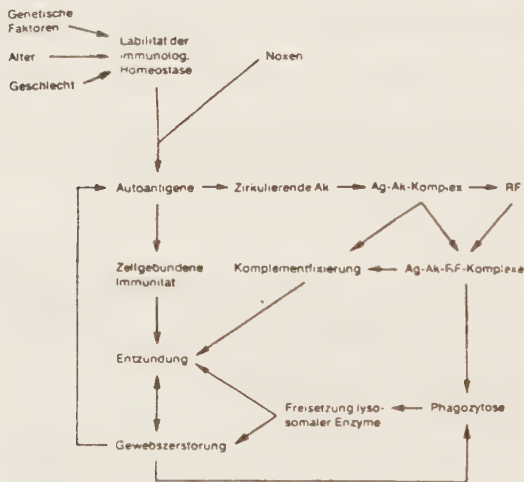


Abbildung 1: Pathogenese der c.P. nach Müller

Was sind nun diese einzelnen immunologischen Veränderungen? Der theoretische Ansatz, daß ein Start-Agens von außen die Krankheit in Gang setzt, führte zu einigen interessanten Entdeckungen: So wurden z.B. in den Gelenken und im Stuhl von c.P.-Patienten häufiger als bei Gesunden diphteroide Stäbchen gefunden (207).

Auch auf andere Mikroorganismen, die Mykoplasmen, richtet sich erhöhte Aufmerksamkeit, zumal diese die Fähigkeit zur molekularen Mimikry besitzen, indem sie Antigene des Gastorganismus adsorbieren (67). Hier ergeben sich ganz deutliche Hinweise auf genetische und immunologische Krankheitsprozesse. Aber auch auf dem Gebiet der Virusgenese der c.P. wird heute intensiv geforscht (86). Berichte über ein Interferenzphänomen zwischen Synovialzellen von Polyarthritikern und Rubella-Viren konnten allerdings nicht bestätigt werden (96, 168). Jedoch geht die Suche nach einer Expression neuer Antigene an Synovialzellen von Polyarthritikern weiter (45), da man z.B. am C-ornica-Virus-Modell gelernt hat, daß eine Infektion mit diesem Virus zu veränderten Zellantigenen führt. So konnte möglicherweise ein Synovia-typisches Protein (16, 29) definiert werden.

Bei der weiteren Suche nach immunologischen Befunden, die mit c.P. korreliert sind, stieß man bald darauf, daß ein bestimmtes "genetisches Make-up" mit dieser Krankheit assoziiert ist (8, 32, 33, 66, 93, 126, 127, 135, 140, 155, 177, 201, 202, 240). Es erwies sich, daß das Haptoglobulin Hp² (151), das α_1 -Antitrypsin MZ, SZ (57) und das Erythrocytenantigen P₁ mit der c.P. korreliert sind (27). Das Hauptaugenmerk jedoch fiel auf die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes auf dem Chromosom 6. Bei Patienten mit c.P. ist die Häufigkeit von HLA - B 15 (27), HLA Bw 40 (154), HLA - Cw 3 (154), HLA - DRw 4 (159, 160, 201), HLA - Dw 3 (159), HLA - Dw 4 (203) erhöht.

Mit einem besonders hohen Rheumafaktorititer scheint HLA-Dw 3 korreliert zu sein. Der Einfluß des HLA-Systems wird durch mehrere Theorien erklärt. Die HLA-Genprodukte, also die HLA-Antigene auf Gewebsstrukturen des Organismus, dienen möglicherweise als Rezeptoren für Viren. Ein Beispiel ist das Semliki-Forest-Virus (107). Bei der immunologischen Überwachung durch T-Lymphozyten, die möglicherweise nur eine einzige Spezifität haben, nämlich "altered self", stellt der HLA-Komplex dann mit dem Antigen z.B. viralen Ursprungs ein Neoantigen dar (3, 20, 241). Beispiel ist das C-oncornavirus-Modell (16, 29). Dadurch könnte es zu einer Immunreaktion gegen das Neoantigen und im Gefolge zu autoaggressiven Prozessen gegen die betroffenen Gewebsstrukturen kommen. Die molekulare Nachahmung durch Mykoplasmen wurde schon kurz erwähnt. Eine wichtige Rolle spielt das HLA-System bei der Interaktion von T-Lymphozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten. Zur Immunantwort ist die Antigen-Präsentation zusammen mit dem richtigen HLA-Komplex nötig (78, 118, 121, 179, 242). Und schließlich besteht vielleicht ein Kopplungsgleichgewicht zwischen den eigentlichen Krankheitsempfänglichkeitsgenen und den Genen des HLA-Systems. Die weitreichendsten und beeindruckendsten Veränderungen jedoch treten am Immunsystem selbst auf: Die aktivierten Synovialzellen selbst produzieren Kollagenase (233) und Plasminogenaktivator, und obwohl sie auch in erhöhtem Maße Prostaglandine herstellen (63), so sind sie doch gegen die Wachstumsheftung durch Prostaglandine resistent.

Dies spricht entweder für eine Selektion prostaglandinresistenter Fibroblasten oder für den Verlust der Hemmung durch chronische Exposition (124). Daneben besteht ein Proliferationsreiz (42) durch Plättchenfaktor, Somatomedin und anderes mehr. Die Phagozytose von IgG, IgM und C₃ wird nachgewiesen (112, 122). Hinter den Randzellen finden sich massive mononukleäre Rundzellinfiltrate mit gelegentlich regelrechten Reaktionszentren. Dort vorkommende B-Lymphozyten sind verantwortlich für die Produktion von IgG, IgM und Rheumafaktoren (136). Selbst 50% der Plasmazellen seronegativer Patienten enthalten Rheumafaktoren. Eine weitere Aufgabe der B-Lymphozyten ist die Präsentation von Antigen für die T-Lymphozyten in Verbindung mit dem richtigen HLA-Komplex.

Die entzündete Synovialis ist dicht infiltriert mit T-Lymphozyten (125, 219), die häufig in blastogener Transformation aktiviert sind (9, 123). T-Lymphozyten sind zytotoxisch, und zwar immunprotektiv wie auch immunpathologisch (48, 49, 111), sie sind entscheidend beteiligt an der T-Zellvermittelten Entzündung (DTH-Reaktion), außerdem als Helfer- und Suppressorzellen für Proliferation und Antikörperproduktion der B-Lymphozyten verantwortlich (147, 211). Die Bedeutung der T-Lymphozyten für zellvermittelte Immunprozesse ist enorm (199). Dies zeigt schon die Tatsache, daß eine Ductus-thoracicus-Drainage bei der c.P. als Therapie (128, 231) wirksam ist, wodurch ja vor allem T-Lymphozyten eliminiert werden, während Patienten mit einer Agammaglobulinämie sehr wohl ein c.P.-ähnliches Syndrom entwickeln können (10, 35, 95).

Dies führte zu der Annahme, daß Antikörper weniger als Auslöser der Krankheit anzusehen sind, sondern vielmehr an der "Selfperpetuation", der Chronizität, beteiligt sind. Belege für die entscheidende Rolle der T-Lymphozyten sind auch die Wirksamkeit der immunmodulatorischen Substanz Ieramisol (27, 146) und der erfolgreiche Transfer einer antigeninduzierten Arthritis durch immunisierte T-Zellen auf an sich genetisch resistente Mäuse (27, 164, 234). T-Zellen mit einer Aktivität gegen Kollagen werden bei den meisten Patienten gefunden (217). Häufig vorkommende Zellen in der entzündlich veränderten Synovialis sind Makrophagen, die über Lymphokine zytotoxisch wirken (5) und auf Kontakt mit Komplementspaltprodukten oder nach Komplementbindung lysosomale Enzyme (39), außerdem Kollagenase und Plasminogenaktivator freisetzen (222, 225), wenn sie durch T-Lymphozytenprodukte - Lymphokine - aktiviert werden. Synovialzellen stimulieren sie zur Kollagenase- und Prostaglandinsynthese (64), besonders in Zusammenarbeit mit T-Lymphozyten (62). Makrophagen von Polyarthritikern induzieren eine Gefäßproliferation (169) und aktivieren die Osteoklasten (110).

In der akuten Phase der Krankheit wandern aufgrund ihrer ausgeprägten Chemotaxis (243) bis zu 10^9 Granulozyten am Tag in das Gelenkinnere ein (108). Eine Rückkehr in die Zirkulation ist nicht möglich, die Zellen bleiben gleichsam in der Synovia gefangen. Ein solches "trapping" wird nicht nur für Zellen, sondern auch für humorale Mediatoren, etwa Komplement, angenommen.

wenn die polymorphkernigen Granulozyten Immunkomplexe phagozytieren, so scheinen sie wie mit Trauben angefüllt, und man nennt sie dann Rhagozyten. Ein "Überfressen" führt zur Selbstzerstörung, zum Freisetzen von O_2^- -Ionen und von lysosomalen Enzymen. Offensichtlich kann das Kupfer des Caeruloplasmins diese Selbstvergiftung limitieren. Weitere Enzyme der Granulozyten sind Kollagenase und Elastase, die zur Zerstörung des Knorpels beitragen (157).

Bedeutende Veränderungen spielen sich bei der c.P. auch auf nichtzellulärem, humoralem Niveau ab. Auffällig sind besonders die "Rheumafaktoren", IgM-, IgG- oder IgA-Autoantikörper gegen den Fc-Anteil der IgG-Antikörper, die in 60% bis 75% der Patienten in der Synovialis nachgewiesen werden (148, 149, 150, 236) und, da sie an der "selfperpetuation" beteiligt sind, zu einem schweren Krankheitsbild mit einer schlechten Prognose führen (44). Diese Rheumafaktoren haben eine sehr starke Affinität zu veränderten Globulinen, die Antikörper oder Komplement gebunden haben. Häufig bilden sie sekundäre Immunkomplexe, d.h., sie sind gleichsam ihr eigenes Substrat (171), und sie haben die Fähigkeit zur Komplementbindung. Ein IgM-Rheumafaktor wird in den krankheitsspezifischen Lungenläsionen gefunden (68), 67% der Patienten mit Vaskulitis haben einen IgG-Rheumafaktor. Beim Nachweis im Serum der Patienten spricht man von seropositiven Fällen. Die Bildung von Rheumafaktoren scheint an das Vorhandensein von Immunkomplexen und von durch Entzündungsprozesse veränderten, körpereigenem Material geknüpft zu sein.

Immunkomplexe sind, wenn sie im Blut vorliegen, bei Rheumakranken oft für ein Hyperviskositätssyndrom (114, 170) und für Kryoglobulinämie (232) verantwortlich. Sie kommen in der Synovia (106), der Synovialis (148), den Gefäßen der extraartikulären Läsionen (51, 84) und an der Oberfläche des Gelenkknorpels angelagert vor (52, 53, 158), wo sie zur Adhäsion von Granulozyten und wegen der Avaskularität des Knorpels zur zentripetalen Ausrichtung der Läsion führen. Bestandteile der Komplexe können Rheumafaktoren sein; eine Komplementaktivierung führt zu weiteren entzündlichen Reaktionen.

Die Komplemente spielen also eine wichtige Rolle als Entzündungsmediatoren beim Pathomechanismus der Krankheit. Das System wird außer von Immunkomplexen durch das C-reaktive Protein aktiviert, das somit einen guten Marker für die Prozeßaktivität darstellt. Komplement findet sich beispielsweise in der Synovia (106) - aber auch in der Synovialis (176), die die Fähigkeit hat, es selbst zu produzieren (181). Komplementbindung an Makrophagen führt zur Freisetzung vasoaktiv und chemotaktisch wirksamer Spaltprodukte (25, 71, 229), die Granulozyten zum Einwandern und zum Freisetzen lysosomaler Enzyme veranlassen. Andere Entzündungsmediatoren bei der c.P. sind die Kinine (79, 145, 226). Sie sind ebenfalls vasoaktiv und chemotaktisch für Granulozyten und Monozyten, aktivieren Makrophagen, Osteoklasten und Synovialiszellen und wirken mitogen.

Auch das Blutgerinnungssystem ist in die Krankheit mit einbezogen: Eine Akkumulation von Fibrin auf der Synovialis, auf Knorpel und in Gerinnseln in Synovia und in Synovialisinfarkten führt zu schweren Ernährungsstörungen und zur Chronizität der Erkrankung, wenn Immunkomplexe mit eingeschlossen werden (92, 220).

Zuletzt sollen noch kurz die bei der rheumatischen Entzündung freigesetzten Enzyme besprochen werden. Erhöhte Mengen vor allem lysosomaler Enzyme werden nachgewiesen - β -Galactosidase, β -Glucuronidase, N-Acetyl-Glucosaminidase, saure Osteoblastenphosphatase, Leucinaminopeptidase, Arylsulfatase A (116). Bei den lysosomalen Enzymen läßt sich eine für die c.P. typische Rückkopplung erkennen. Diese Proteasen führen zur Komplementaktivierung, dies wiederum zur Freisetzung lysosomaler Enzyme durch Granulozyten. Insbesondere die neutralen Metalloproteasen (189) verursachen Knorpelschäden (120) und veranlassen die Fibroblasten zur Kollagenasesynthese. Kollagenase ist besonders wirksam an der Kontaktstelle von Synovium bzw. Pannus mit Knorpel (238). Sie wird außer von Synovialiszellen (80) auch von Makrophagen (139) und Granulozyten synthetisiert. Unter normalen Umständen bilden Proteasen mit ihren Inhibitoren reversible Komplexe, wodurch die Entzündung limitiert wird. Bei der c.P. jedoch scheint das Verhältnis Proteasen zu Inhibitoren gestört (100), die Hemmung durch α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin (156) und B_1 -Antikollagenase (239) durch einen Überschuß von Proteasen aufgehoben.

So lassen sich die Befunde, daß sowohl erhöhte (28, 244), als häufig auch erniedrigte (31) Inhibitorenspiegel in der Synovia gefunden werden, verstehen.

1.2. Ziele der vorliegenden Untersuchung

Sowohl das menschliche Leid, das durch die c.P. hervorgerufen wird, als auch der Beitrag, den die Gesellschaft, die Solidargemeinschaft der Versicherten, zur Versorgung der Erkrankten aufwenden muß ist immens. Da nun die Ätiologie noch weitgehend unbekannt ist, scheint der hohe Aufwand an Mitteln, die zur Erforschung der Ursachen weltweit aufgewendet werden, durchaus gerechtfertigt. Eine genaue Kenntnis des Mechanismus der c.P.-Entstehung könnte Grundlage einer kausalen Therapie oder Prophylaxe werden, könnte großen Einfluß auf die Diagnostik haben, z.B. in der Abschätzung von Risikofaktoren, oder der Entwicklung von Screening-Methoden, so die Kosten der entsprechenden Tests nur gering genug gehalten werden, und sie wirkt wohl auch fort auf Verständnis und Behandlung weiterer Immunkrankheiten, wie z.B. den Lupus erythematodes oder die Immunthyreoiditis.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit bestimmte immunfunktionelle und immungenetische Parameter bei Patienten mit c.P. und Sjögren-Syndrom von einem Normalprobandenkollektiv und einem Rheumatiker-gesamtkollektiv abweichen, gegebenenfalls die c.P. mit Sjögren-Syndrom als nosologische Entität charakterisieren.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Probanden

Lymphozyten von 234 Patienten unserer Rheumaambulanz, die entsprechend den New York-Kriterien an einer gesicherten chronischen Polyarthrititis litten, wurden immunfunktionell (Mitogen- und Antigenstimulation, Suppressorzellaktivität) untersucht. Die HLA-A, -B und C-Antigene wurden simultan bestimmt. Von 234 Patienten im Alter von 18 bis 76 Jahren (Altersmittelwert 47 a, SD = 16,2 a) waren 29% Männer und 71% Frauen. Zum Untersuchungszeitpunkt erhielten 79 Patienten eine krankheitsspezifische Therapie mit Medikamenten, die entsprechend der Literatur (130, 161) die Lymphozytenfunktion in vitro nicht beeinträchtigen. Die übrigen 155 Patienten waren untherapiert.

Aus diesem Rheumatikergesamtkollektiv wurde eine Sicca-Gruppe selektiert, die aus 33 Patienten mit der gesicherten Diagnose Sjögren-Syndrom bestand. Bei dieser Gruppe waren 84% der Patienten Frauen, das Alter der Patienten reichte von 23 bis 75 Jahren (Altersmittelwert 49 a, SD 11,3 a). Von diesen 33 Patienten waren 10 therapiert.

Als Vergleichskollektiv dienten 98 gesunde Probanden, Blutspender im Alter von 17 bis 57 Jahren (Altersmittelwert 37 a, SD 9,4 a), davon waren 62% Frauen und 38% Männer. Es wurden analoge immunkinetische und -genetische Untersuchungen durchgeführt.

Die Blutentnahmen erfolgten jeweils unter sterilen Kriterien mit heparinisierten Einmalspritzen (1ml = 5.000 IE Heparin auf 100ml Blut).

2.2. HLA-System

2.2.1. Allgemeines

Erstmals 1954 beschrieb Dausset (60) Antikörper im Serum polytransfundierter Patienten, die gegen Leukozyten einzelner Blutspender reagierten, 1958 definierte er "MAC" - heute HLA-A2 genannt (59). Dieses System der "human leukocyte antigens", kurz HLA kommt wahrscheinlich auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen des menschlichen Organismus vor und spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von "fremd" und "selbst" durch das Immunsystem. Heute kann man fünf verschiedene Serien von HLA-Antigenen unterscheiden. Serologisch werden HLA-A, -B und -C-Antigene definiert, wobei vor allem die Entwicklung des Mikrozytotoxizitätstest durch Terasaki (212) bedeutende Fortschritte brachte. Die Antigene der D-Gruppe werden vorzugsweise durch die gemischte Lymphozytenreaktion nachgewiesen, die zuerst auf B-Zellen entdeckten DR-Antigene (123) serologisch.

Die Loci der für das HLA-System kodierenden Gene zeigt Abbildung 2:

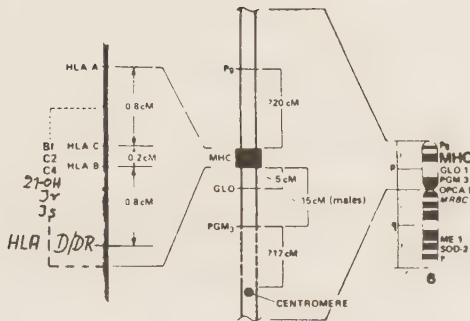


Abbildung 2: Genloci des HLA-Systems auf dem 6. Chromosom
des Menschen nach Mc Kusick (132)

cM = CentiMorgan (% Rekombinationshäufigkeit)

Pg = Pepsinogen

MHC = Major Histocompatibility Complex

GLO 1 = Glyoxulase 1

PGM 3 = Phosphoglukomutase 3

Bf = C₃-Proaktivator

C₂, C₄ = Komplementfaktoren

Jr = Gene f. Immunantwort

Js = Gene f. Immunsuppression

21-OH = 21 Hydroxylase

Die Vererbung des Systems erfolgt kombinant nach den Mendelschen regeln.

2.2.2. Verwendete Reagenzien

1. Heparin - Natrium: 25.000 IE/5ml
(Braun Melsungen AG)
2. McCoy's 5_A-Medium
mit 10% Fetal Calf Serum und L-Glutamin
(Gibco Europe, Glasgow, Schottland)
3. HLA - Antiseren
(Biotest Seruminstitut Frankfurt,
Behringwerke AG, Marburg)
4. Kaninchen - Komplement ORAX 14/15:
(Behringwerke AG, Marburg)
5. Eosin: 5 %ige Lösung in Aqua dest., filtriert
(Merck, Darmstadt)
6. Mikrotiterplatten 96 F:
(Nunc Intermed, Roskilde, Dänemark)

2.2.3. Technik

HLA-A, -B und -C sind serologisch definierte Antigene. Die Ansätze werden nach dem Mikrotoxizitätstest nach Terasaki (212) durchgeführt. Dieser basiert darauf, daß die Zellmembranen der Lymphozyten, die das zu testende Antigen aufweisen, durch die in den spezifischen Antiseren enthaltenen Antikörper in Verbindung mit Komplement zerstört werden.

Während Lymphozyten mit intakter Zellmembran sich mit Eosin nicht anfärben, wird der Farbstoff in lysierten Zellen sehr wohl angereichert. Färbung bedeutet somit, daß die entsprechende Probe HLA- x positiv ist.

Untersuchungsmaterial waren 10 ml Heparinblut pro Proband (0,1 ml Heparin + 9,9 ml Blut). Die aus dem peripheren Blut separierten Lymphozyten (Methode unter 2.3.3., Gewinnung der Lymphozyten) wurden in 1 ml McCoy's Medium aufgeschwemmt, und anschließend gezählt, und auf 4×10^6 Lymphozyten/ml Medium eingestellt (s. 2.3.3. Lymphozytengewinnung). Für die weitere Typisierung wurden die Mikrotiterplatten benutzt. Wir beschickten für eine Blutprobe je 4 Näpfe mit jeweils 1 μ l eines bestimmten Antiserums zusammen mit 5 μ l Paraffin - insgesamt 264 Näpfe pro Blutprobe. Nachdem wir jedem Napf ca. 2.000 bis 4.000 Lymphozyten, suspendiert in 1 μ l Medium, beigegeben hatten, wurden die Platten für 60 Minuten bei 20°C inkubiert. Um den bei der Zytolyse auftretenden Komplementverbrauch auszugleichen, wurde in jeden Napf 5 μ l Kaninchenkomplement gegeben. Nach weiteren 90 Minuten erfolgte die Zugabe von je 4 μ l unserer Eosinlösung, 15 Minuten später wurde die Antigen-Antikörperreaktion gestoppt und die Zellen fixiert. Verwendet wurden dazu je 10 μ l 37%iges Formalin, das mit NaOH auf den pH-Wert von 7,25 eingestellt worden ist. Nach Formalinzugabe wurden die Platten mit Deckgläsern vor Verdunstung geschützt.

Nach einigen Stunden konnte die Auswertung beginnen. Gewertet wurde der Prozentsatz lysierter und daher mit Eosin angefärbter Lymphozyten, die größer als intakte Lymphozyten sind, unscharf begrenzt und dunkel verfärbt. Die gefundenen Reaktionsstärken werden in vorgedruckte Antikörperlisten eingetragen. Dabei gilt:

Reaktionsstärke 1 = 0 -10 % zerstörter Zellen = negativer
Befund

Reaktionsstärke 2 = 10-20 % zerstörter Zellen = negativer
Befund

Reaktionsstärke 4 = 40-60 % zerstörter Zellen = fraglicher
Befund

Reaktionsstärke 6 = 60-80 % zerstörter Zellen = positiver
Befund

Reaktionsstärke 8 = 80-100% zerstörter Zellen = positiver
Befund

Wenn in 4 mit vom Typ her identischen Antigen-Antikörpergemischen beschickten Nöpfen eine Reaktion Stärke 6 - 8 stattgefunden hatte, wurde das Vorliegen des entsprechenden HLA - Antigens auf der Lymphozytenoberfläche angenommen.

2.3. Lymphozytenkinetik

2.3.1. Allgemeines

Während der letzten Jahre wurde Schritt um Schritt aufgedeckt, wie vielfältig humorale und zelluläre Immunmechanismen ineinandergreifen. So wurde zuerst eine dichotome Aufteilung der Lymphozyten in thymusabhängige, zytotoxische und in Bursa-Äquivalent-abhängige antikörperproduzierende Lymphozyten postuliert (54, 55, 210), später konnten weitere Lymphozytensubpopulationen definiert werden:

T-Helferzellen: An Mäusen wurde gezeigt, daß antikörperproduzierende B-Zellen nur in Gegenwart von T-Zellen adäquat auf bestimmte Antigenstimuli mit Proliferation und Differenziation antworten können (46, 141). Zu dieser Helfer-Zellpopulation gehören auch die für die DTH-Reaktion (Delayed Type Hypersensitivity) verantwortlichen T-Zellen (37), die ebenso auf Antigenstimulation reagieren. Die DTH-Reaktion ist bei Polyarthritikern stark herabgesetzt (19, 230). Zytotoxische Zellen bedürfen der Unterstützung von Helferzellen, um ihren Aufgaben gerecht zu werden (36, 38). In der MLC (mixed lymphocyte culture) sind B-Lymphozyten die primären Auslöser einer durch nicht übereinstimmende HLA-D-Antigene ausgelösten Proliferation von Responder-T-Helferzellen.

T-Suppressorzellen: Ihre Funktion ist den Helferzellen entgegengerichtet, sie unterdrücken die Proliferation von B-Zellen in antikörperproduzierende Zellen und von T-Vorläufern in T-Effektoren (88).

Mit ihnen läßt sich Immuntoleranz für ein bestimmtes Antigen auf immunkompetente Individuen übertragen, wobei diese weiter ganz normal mit Antikörperbildung auf alle anderen Antigene reagieren. Bei Patienten mit Agammaglobulinaemie scheinen sie die B-Zellproliferation auf Stimulation mit Mitogenen zu supprimieren (228). In der MLC kann diese Subpopulation die in vitro-Proliferation von T-Helferzellen hemmen.

Schließlich können ca. 10% der Lymphozyten keinen dieser Gruppen zugeordnet werden: man nennt sie daher Null-Lymphozyten. Sie besitzen zytotoxische Eigenschaften, aktive Nullzellen werden Killerzellen genannt. Natural Killer Cells haben ihre besondere Aufgabe in der Elimination transformierter Zellen.

Antigene nun sind Stoffe, die aufgrund des molekularen räumlichen Aufbaus der jeweiligen Substanz (Tertiär- oder sogar Quartärstruktur!) einen spezifischen Reiz für das Immunsystem darstellen und es zur Antikörpersynthese oder zellulären Reaktionen stimulieren. Dagegen werden die Veränderungen, die durch Mitogene, nämlich pflanzliche Lectine oder Polysaccharide von Bakterien, induziert sind, vielfach als unspezifisch angesehen (200). Durch Exposition von Lymphozyten gegen Mitogene und Antigene wird deren Reaktionsfähigkeit getestet (182).

Im Antigenansatz kommen mit Varidase (einem Streptokokkenantigen) Lymphozyten insgesamt (97, 168, 214), mit Tetanustoxoid T-Zellen (30), mit Diphtherietoxoid T- und B-Zellen (184), mit Tuberculin T-Zellen (77), mit Vaccinia T-Zellen (70), mit Masern T-Zellen (180), mit Rubella T-Zellen (196) und mit einem viralen Ag-Cocktail T-Zellen zur Stimulation.

Erhöhte Lymphoblastopoese zeigen im Mitogenansatz mit Protein A (von *Staphylococcus aureus*) T- und Null-Zellen (184), mit Concanavalin A vorzugsweise T-Suppressorzellen (143, 165, 174, 175, 192), mit Phytohämagglutinin vorzugsweise T-Helferzellen (73, 83, 153) und mit Pokeweed-Mitogen B-Zellen (73).

Im Suppressorzellansatz (143, 165, 174) kann die Suppressorzellaktivität getestet werden. Die Versuchsanordnung nutzt die Stimulierbarkeit von Suppressorzellen (B) durch Concanavalin A aus. Nachdem sie bestrahlt worden sind, kommen sie mit nicht bestrahlten Responderzellen (A) der selben Blutprobe zur Inkubation. Um diese zu stimulieren, werden entweder Mitogene (M) oder bestrahlte allogene Stimulatorzellen (S) zugesetzt (b_1). Als Kontrollen fungieren jeweils sogenannte Bystander, die ebenso vom selben Spender stammen, bestrahlt, jedoch nicht mit Concanavalin A vorbehandelt sind (a_1). Die Ergebnisse müssen noch um die Leerwerte (b_2 , a_2) korrigiert werden. Eine anschauliche Darstellung gibt Abbildung 3.

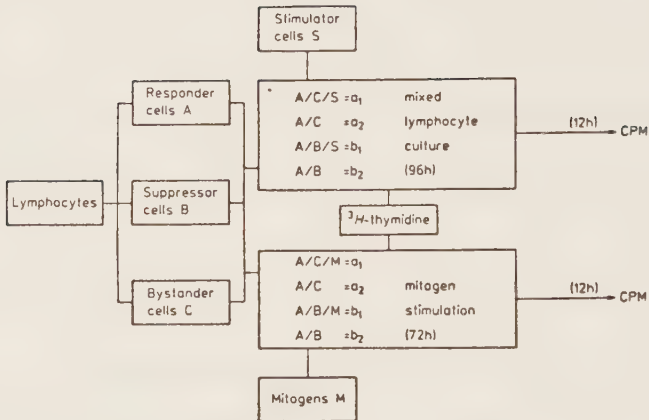


Abbildung 3: Suppressorzelltest nach Eckstein, Mempel, Heim und Bolte (75). Erklärung s. Text

weitere Angaben erfolgen im Abschnitt Suppressorzellenansatz (2.3.4.2.)!

2.3.2. Verwendete Reagenzien

1. Heparin-Natrium: 25.000 IE/5ml

(B. Braun Melsungen AG)

2. Ficoll-Isopaque-Lösung (d = 1,077)

(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)

3. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): (pH 7,2)
(Apotheke der klinischen Universitätsanstalten München)
4. RPMI 1640 Medium mit HEPES-Puffer
(Gibco Europe, Glasgow, Schottland)
5. Penicilline-Streptomycin (10.000 units/ml)
(Gibco Europe, Glasgow, Schottland)
6. L-Glutamine (200 mM)
(Gibco Europe, Glasgow, Schottland)
7. Humanes AB-Serum
(BRK, Blutspendezentrale München)
8. Mikrotitorplatten 60 x 10 ul
(Nunc Intermed, Roskilde, Dänemark)
9. Protein A (Prot. A)
(Sigma Chemie, München)
10. Concanavalin A (Con A)
(Sigma Chemie, München)
11. Phytohämagglutinin (PHA)
(Wellcome, Dartford, England)
12. Pokeweed-Mitogen (PWM)
(Gibco Europe, Glasgow, Schottland)

13. Varidase 125.000 I.E. Fibrinolytikum
(Lederle Wolfratshausen)
14. Tetanustoxoid (2600 LF/ml)
(Behringwerke AG, Marburg)
15. Diphterietoxoid (2290 LF/ml)
(Behringwerke AG, Marburg)
16. Tuberculin GT 1 1 IE/0,1ml
17. Tuberculin GT 10 10 IE/0,1ml
(Behringwerke AG, Marburg)
18. Vaccinia-Antigen
(Behringwerke AG, Marburg)
19. Masern-Antigen für die KBR OTIO 04/05
(Behringwerke AG, Marburg)
20. Röteln-Antigene für die KBR ORBI 04/05
(Behringwerke AG, Marburg)
21. Antigen-Cocktail O.P. - Nr. 13
(Behringwerke AG, Marburg)
22. 3H-Thymidine
(Amersham international, Amersham, England)

23. Szintillationsmischung (6g PPO, 10mg POPOP, 1l Toluol)
(Carl Roth KG, Karlsruhe)

24. Zählfläschchen für die Flüssigkeit-Szintillation
(Zinsser Analytic, Frankfurt)

2.3.3. Gewinnung der Lymphozyten

Untersuchungsmaterial waren 100 ml steriles Heparinblut pro Proband. Es kam die Methode nach Boyum (26) zur Anwendung: In 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 1/3 Ficoll-Isopaque mit 2/3 Blut überschichtet und 20 Minuten bei 2000 U/min. bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Die über den Dichtegradienten gewonnene Suspension mononukleärer Zellen - sie setzten sich als Ring zwischen Ficoll-Isopaque und Serum ab - wurde in Zentrifugenröhrchen gesammelt, im Verhältnis 2 : 1 mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung versetzt und nochmals 10 Minuten bei Zimmertemperatur mit einer Drehzahl von 1500 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wieder in PBS aufgeschwemmt und der Waschvorgang noch zweimal wiederholt.

Schließlich wurden die Zellen in RPMI-1640-Kulturmedium mit HEPES-Puffer, supplementiert mit 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % L-Glutamin und 20 % humanem AB-Serum, aufgeschwemmt. Das Lymphozyten/Monozytenverhältnis dieser Suspension betrug bei allen untersuchten Probanden näherungsweise 4 : 1.

Zunächst mußte festgestellt werden, wieviel Lymphozyten sich in der gewonnenen Suspension befanden. Dazu verdünnten wir 1 Teil Lymphozytensuspension (0,5 Teilstriche auf der benutzten Leukozytenpipette) mit 21 Teilen 1%iger Essigsäure (Flüssigkeitsstand auf Teilstrich 11 der Pipette). Nachdem die Pipette drei Minuten auf dem elektrischen Rüttler geschüttelt wurde, verwarfen wir die unteren 0,5 Einheiten des Inhalts, der hier immer noch im wesentlichen nur aus Essigsäure bestand. Somit erhielten wir ein 20-fache Verdünnung. Dann brachten wir von der in der Leukozytenpipette befindlichen Flüssigkeit jeweils einen Tropfen auf die beiden freien Enden des mittleren Balkens einer vorbereiteten Neubauerzählkammer und ermittelten am Mikroskop im Dunkelfeld mit einem 40er Objektiv unter Benutzung einer Zähluhr die Lymphozytenzahl.

Bei der Zähltechnik in der Neubauerkammer verfahren wir wie folgt: Wir gingen meanderartig durch die Felderflächen der Kammer und zählten die Lymphozyten in vier Felderflächen aus, und zwar jeweils in zwei einander diagonal gegenüberliegenden Felderflächen auf beiden Seiten des horizontalen Mittelbalkens. Aus diesen errechneten wir den Mittelwert. Da eine Felderfläche ein Volumen von $0,1\text{mm}^3$ hat, läßt sich die Lymphozytenzahl für 1mm^3 oder 1 ml ($= 10^3\text{mm}^3$) leicht errechnen. In der unverdünnten Suspension befindet sich dann rückgerechnet eine 20-fache höhere Lymphozytenkonzentration: Allgemein gilt also für die Errechnung der Lymphozytenzahl in 1 ml Lymphozytenkonzentrat aus der in der Neubauerkammer ermittelten Lymphozytenzahl folgende mathematische Formel:

$$\begin{aligned} & \text{Lymphozytenzahl in } 0,1 \text{ mm}^3 \times 10 (= 1 \text{ mm}^3) \times \\ & \times 20 (= \text{Verdünnung}) \times 1000 (= 1 \text{ cm}^3) = \\ & = \text{Lymphozytenzahl in 1 ml Lymphozytenkonzentrat} \end{aligned}$$

Die benötigte Lymphozytenzahl ($= 20 \times 10^6$) konnte also nun leicht aus der Suspension entnommen werden und mit Kulturmedium auf 10 ml gestreckt werden.

2.3.4. Kulturverfahren

2.3.4.1. Mitogen- und Antigenkulturen

Die 14 verschiedenen Mitogene und Antigene und jeweils eine Nullkontrolle wurden auf Mikrotiterplatten getestet. Da jeder Ansatz sechsfach erstellt wurde, waren insgesamt also $16 \times 6 = 96$ Plattennäpfe mit je $0,1 \times 10^6$ Lymphozyten zu beschicken. Für die somit benötigte Zellzahl von $9,6 \times 10^6$ wurde unsere Zellsuspension nochmals mit Kulturmedium verdünnt und auf $10 \times 10^6 / 10 \text{ ml}$ eingestellt. Jeder Napf erhielt $100 \mu\text{l}$ Medium, (entsprechend $0,1 \times 10^6$ Lymphozyten), je sechs Näpfe wurden gegen die folgenden Endkonzentrationen der verschiedenen Mitogene getestet:

Protein A	12,5 μg
Concanavalin A	25 μg
	12,5 μg
Pokeweed Mitogen (PWM)	2,5 μg
Phytohämagglutinin (PHA)	1 μg ,

außerdem gegen die Endverdünnungen der vom Hersteller angegebenen Stammlösungen mehrerer bakterieller Antigene:

Varidase	2 μ l
Tetanustoxoid	2,5 μ l
Diphtherietoxoid	2,5 μ l
Tuberculin GT 1	1 μ l
Tuberculin GT 10	0,5 μ l

und viraler Antigene:

Masernantigen	0,5 μ l
Vacciniaantigen	0,5 μ l
Rötelnantigen	16 μ l
Ag-Cocktail	2,75 μ l

Die Platten wurden mit selbstklebender Plastikfolie verschlossen, Mitogenansätze kamen für drei Tage, Antigenansätze für sechs Tage bei 37°C in einen Brutschrank, der eine feuchte 5%ige CO₂-Atmosphäre aufrechterhielt.

2.3.4.2. Suppressorzellansatz

Dem Verhältnis des Pestansatzes für Suppressorzellen ist Abbildung 3 sehr dienlich. Es wurde eine Lymphozytensuspension in Kulturmedium mit einer Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml (10-fach höher als im Antigen/Mitogen-Ansatz!) eingestellt.

Die Induktion von Suppressorzellaktivität erfolgte durch Zugabe von 150 mg Concanavalin A zu 1 ml Zellsuspension, die Menge der Flüssigkeit wurde mit Kulturmedium auf 2,5 ml gestreckt. Somit waren 4×10^6 Zellen/ml im Ansatz enthalten. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Suppressorzellen für 48 Stunden in einer feuchten, 37°C warmen CO_2 -Atmosphäre inkubiert.

Die zur Konstanthaltung der Zellzahl in den Kontrollansätzen benötigten Bystanderzellen wurden nicht mit Concanavalin A inkubiert, außerdem sofort auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt, die als Responderzellen vorgesehenen Lymphozyten waren bis zum Versuchsbeginn unter flüssigem Stickstoff gelagert (152). Zur Stimulation der Responderzellen verfügten wir über einen ebenfalls tiefgefrorenen Lymphozytenpool von fünf gesunden, unverwandten, HLA-D-differenten Spendern, außerdem fanden die Mitogene protein A, Concanavalin A, PWM und PHA in den bereits angegebenen Konzentrationen Verwendung. Im Folgenden arbeiteten wir nach einer Modifikation des Assays (74, 75, 175, 192).

Nach zwei Tagen wurde die Suppressorzellaktivität getestet. Dazu tauten wir Responderzellen und Stimulatorzellen-Pool auf Eis auf, die halbaufgetauten Zellen wurden in Röhrchen gegeben, diese mit AB-Serum aufgefüllt. Die Bystanderzellen zentrifugierten wir einaml ab und stellten sie mit dem Kulturmedium auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml ein, ebenso die mit Con A behandelten Zellen, nur daß diese dreimal mit PBS gewaschen wurden, und die Zellen des Pools.

Zur Hemmung der Proliferationsaktivitäten von Suppressor-, Bystander- und Stimulatorzellen setzten wir diese der Strahlung einer Cs-137-Quelle (wählschmiller, Markdorf/Bodensee) von 40 Gy aus. Nun war sichergestellt, daß wir von Bystander- und Stimulatorzellen keinen Einbau von ^3H -Thymidin zu messen bekommen würden, während der durch die Bestrahlung nicht gänzlich zu verhindernde ^3H -Thymidin-Einbau durch Con-A-aktivierte Suppressorzellen durch Einführung der Kontrolle Responder/Suppressorzellen (b_2) ohne Stimulation weitgehend eliminiert wird (s. 2.4. statistische Methoden). Dies vermeidet falschnegative Resultate (74).

In der gemischten Lymphozytenkultur stimulierten wir auf Mikrotiterplatten in je 200 μl Kulturmedium 5×10^4 Responderzellen durch 5×10^4 Stimulatorzellen in Gegenwart von 5×10^4 Suppressorzellen (b_1) oder Bystanderzellen (a_1), indem wir Responderzellen mit Bystander- bzw. Suppressorzellen mischten und 200 μl dieser Zellsuspension mit 100 μl der Stimulatorzellsuspension oder als Kontrolle mit Kulturmedium (a_2 , b_2) in je einen Napf gaben. Die Ansätze verblieben sechs Tage bei 37°C in einer feuchten CO_2 -Atmosphäre (Abbildung 3).

In separaten Experimenten wurden 5×10^4 Responderzellen in Gegenwart von 5×10^4 Suppressorzellen (b_1) oder Bystanderzellen (a_1) durch die Mitogene Protein A, Concanavalin A, PWM und PHA in den gegebenen Konzentrationen drei Tage stimuliert. Auch hier wurden Kontrollen gegen das Medium mitgeführt (b_2 , a_2). Alle Ansätze erfolgten sechsfach.

2.3.5. Markierungsverfahren

Die Quantifizierung der Blastenbildung geschah durch Messung des Einbaus von radioaktivem Thymidin. Die Ernte der Mitogenkulturen erfolgte am 3. Tag, somit die Zugabe von ^3H -Thymidin ($20\ \mu\text{l}$ pro Napf entsprechen $2\ \mu\text{Ci}$) 48 h nach Kulturansatz. Die Ernte der Antigenkulturen und der MLC's wurde am 6. Tag nach Kulturansatz durchgeführt, die ^3H -Thymidin-Zugabe entsprechend am 5. Tag.

2.3.6. Ernte- und Szintillationsverfahren

Zur Vereinheitlichung der Versuchsanordnung wurden die Platten am 3. bzw. 6. Tag bei -80°C eingefroren und nach dem Auftauen zu einem späteren Termin geerntet. Dazu sammelten wir die Kulturzellen mit der "Erntemaschine" nach Hartzmann und Bach und brachten sie auf Glasfaserfilter. Für jede Kulturplattenreihe mit 12 Näpfen sollten dabei 200 ml Wasser verwendet werden. Die Glasfaserfilter wurden auf einer heizbaren Platte getrocknet und schließlich in Zählbehälter gebracht. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Toluol) verschraubten wir diese Behälter locker und brachten sie entsprechend dem Ernteschema in einen Beta-Counter, der die in die gebildeten Blasten eingebaute Radioaktivität in cpm. mißt. Von den im Counter gefundenen sechs zusammengehörigen Werten berechneten wir das arithmetische Mittel in cpm. Anhand der Blastenbildung konnte dann die Immunitätslage des Probanden bezüglich seiner lymphatischen Zellen beurteilt werden.

2.4 Statistische Methoden

Diese Mittelwerte (counts per minute = cpm) benutzten wir zur Berechnung des prozentualen Suppressions-Grades der Responderzellblastopoesis durch Concanavalin A - aktivierte Lymphozyten in den Suppressorzellansätzen entsprechend der Formel (74). (Vergleiche auch Abbildung 3):

$$\text{Suppression (\%)} = 1 - \frac{b_1 - b_2}{a_1 - a_2} \times 100$$

Wir sind von der Überlegung ausgegangen, daß eine biologische Funktion wie die Suppressorzellaktivität kein negatives Vorzeichen haben kann. Deshalb wurden rechnerisch negative Suppressionswerte gleich 0% gesetzt (74, 75).

Die Daten von Antigen-, Mitogen- und Suppressorzellansatz wurden im T-Test für unverbundene Stichproben bei ungleicher Varianz getestet. Der Test dient dazu, festzustellen, ob sich die Mittelwerte der Grundgesamtheiten zweier Stichproben signifikant unterscheiden (201). Geringere Signifikanz bedeutet höhere Irrtumswahrscheinlichkeit und Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art und 2. Art.

Die Anteile bestimmter HLA-x-Phänotypen wurden in Prozent der Grundgesamtheit angegeben. Das relative Risiko (rR) eines Probanden mit einem Phänotyp HLA-x, an einem mit diesem Phänotyp assoziierten Leiden zu erkranken, errechnet sich nach folgender Formel (94):

$$rR = \frac{n \text{ HLA-x positive Patienten} \times n \text{ HLA-x negative Normalprobanden}}{n \text{ HLA-x positive Normalprobanden} \times n \text{ HLA-x negative Patienten}}$$

Das relative Risiko kann hier als Maß für die Stärke der Assoziation von HLA-Typ und Krankheit angesehen werden. Ab einem $rR > 1$ ist eine positive Assoziation gegeben, bei einem $rR > 2$ ist es sinnvoll, von biologischer Signifikanz zu sprechen. Ist der wert für das $rR < 1$, so besteht in diesem Fall eine negative Assoziation.

3. ERGEBNISSE

3.1. Chronische Polyarthrits, Gesamtkollektiv

Bei unseren Untersuchungen kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Normalprobanden-Kollektiv und c.P.-Gesamtkollektiv fanden sich bei folgenden Parametern:

- Suppressorzellaktivität Protein A	p < 0,5
- Suppressorzellaktivität PWM	p < 0,25
- Suppressorzellaktivität PHA	p < 0,3
- Mitogen Con A (25 µg)	p < 0,25
- Mitogen Con A (12,5 µg)	p < 0,3
- Mitogen PHA	p < 0,2
- Varidase	p < 0,1
- Diphtherietoxoid	p < 0,2
- Vaccinia	p < 0,5

Dagegen unterschieden sich beide Gruppen auf dem 5% - Niveau (p < 0,05) signifikant hinsichtlich folgender Parameter:

- Suppressorzellaktivität Con A (25 µg) p < 0,05
- Suppressorzellaktivität Con A (12,5 µg) p < 0,05
- Tuberculin GT 1 p < 0,0125
- Tuberculin GT 10 p < 0,05
- Rubella p < 0,025
- Antigen-Cocktail p < 0,05

(Abbildung 4-9)

Statistisch hochsignifikante Unterschiede auf dem 1% - Niveau ($p < 0,01$) fanden sich bei:

- Mitogen PWM p < 0,0025
- Tetanustoxoid p < 0,005

(Abbildung 10 und 11)

Statistisch höchstsignifikante Unterschiede auf dem 1% - Niveau ($p < 0,001$) zwischen den beiden Gruppen ergaben sich bei folgenden Parameter:

- Suppressorzellaktivität MLC p < 0,0005
- Mitogen Protein A p < 0,0005
- Masern p < 0,0005

(Abbildung 12-14)

Von unseren 234 Patienten mit gesicherter Polyarthrititis wurde an 171 das HLA-System bezüglich A-, B- und C-Loci bestimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es möglich, für Individuen die Stärke einzelner HLA-Assoziationen mit der c.P. zu bestimmen, indem man für jedes in Frage kommende HLA-Gen das relative Risiko (rR) berechnet, das besagt, um wieviel die statistische Wahrscheinlichkeit bei einem Individuum mit einem bestimmten HLA-Gen größer ist an c.P. zu erkranken, als dies bei Individuen der Fall wäre, die das entsprechende HLA-Gen nicht besitzen. Das relative Risiko kann als Maß für die biologische Signifikanz angesehen werden. Es errechnet sich nach der Formel:

$$rR = \frac{a \times b'}{b \times a'}$$

Dabei bedeuten: a : Anzahl der HLA-x positiven Patienten

a' : Anzahl der HLA-x negativen Patienten

b : Anzahl der HLA-x positiven Normalprobanden

b' : Anzahl der HLA-x negativen Normalprobanden

wir haben unsere Ergebnisse in Tabellen zusammengestellt, in denen die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen HLA-Gene für die Normalprobanden und das c.P.-Gesamtkollektiv sowie das sich daraus ergebene relative Risiko gegenübergestellt sind:

Tabelle 1: HLA-A - System

HLA-A	Kontrollgruppe (n=100)	c.P.-Gruppe (n=171)	rR
A 1	26%	27,5%	1,08
A 2	44%	52,0%	1,38
A 3	31%	22,2%	0,64
A 9	19%	20,5%	1,10
A 10	8%	7 %	0,87
A 11	11%	9,9%	0,89
A 28	5%	5,3%	1,06
A 29	8%	5,3%	0,64
Aw 30+31	4%	3,5%	0,87

wie aus Tabelle 1 hervorgeht, steigt bei keinem HLA-Gen der wert des relativen Risikos über 2 an.

Tabelle 2: HLA-B - System

HLA-B	Kontrollgruppe (n=100)	c.P.-Gruppe (n=171)	rR
B 5	14%	9,9%	0,68
B 7	27%	19,9%	0,67
B 8	14%	23,4%	1,88

B 12	23%	16,4%	0,66
B 13	6%	2,9%	0,47
B 14	6%	4,7%	0,77
B 15	9%	14,6%	1,73
Bw 16	9%	11,7%	1,34
B 17	5%	3,5%	0,69
B 18	7%	5,8%	0,82
B 21	1%	2,3%	2,33
Bw 22	3%	2,9%	0,97
B 27	3%	13,5%	5,05
Bw 35	20%	14,6%	0,68
B 37	4%	2,9%	0,72
B 40	15%	15,8%	1,06
B 53	1%	0 %	0

Aus Tabelle 2 kann man entnehmen, daß HLA-B 21 positive Individuen ein 2,3 mal, HLA-B 27 positive Individuen sogar ein 5 mal höheres relatives Risiko haben, an c.P. zu erkranken.

Tabelle 3: HLA-C - System

HLA-C Kontrollgruppe (n=100) c.P.-Gruppe (n=171) rR

Cw 1	1%	2,9%	2,96
Cw 2	4%	13,5%	3,75
Cw 3	13%	15,8%	1,26
Cw 4	19%	10,5%	0,50
Cw 5	3%	2,9%	0,97
Cw 6	3%	0,6%	0,20
Cw 7	3%	0 %	0

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß HLA-Cw 1 positive Individuen ein 2,96 mal, und HLA-Cw 2 positive Individuen ein 3,75 mal höheres relatives Risiko haben, an c.P. zu erkranken.

3.2. Chronische Polyarthrititis mit Sjögren-Syndrom

Beim Vergleich der beiden Kollektive Patienten mit Sjögren-Syndrom und Normalprobanden kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

Keine statistisch signifikanten Unterschiede fanden sich bei folgenden Parametern:

- Suppressorzellaktivität Protein A	p < 0,10
- Suppressorzellaktivität Con A (12,5 µg)	p < 0,20
- Suppressorzellaktivität PWM	p < 0,35
- Suppressorzellaktivität PHA	p < 0,15
- Mitogen Con A (25 µg)	p < 0,15
- Mitogen PHA	p < 0,45
- Varidase	p < 0,15
- Diphterietoxoid	p < 0,49
- Tuberculin GT 1	p < 0,10
- Tuberculin GT 10	p < 0,15
- Vaccinia	p < 0,40
- Rubella	p < 0,25

Dagegen unterschieden sich beide Gruppen auf dem 5% - Niveau ($p < 0,05$) signifikant hinsichtlich folgender Parameter:

- | | |
|--|--------------|
| - Suppressorzellaktivität Con A (25 μ g) | $p < 0,0125$ |
| - Mitogen Protein A | $p < 0,025$ |
| - Mitogen Con A (12,5 μ g) | $p < 0,05$ |
| - Mitogen PWM | $p < 0,025$ |
| - Masern | $p < 0,0125$ |
| - Antigen-Cocktail | $p < 0,0125$ |

(Abbildung 4, 9, 10, 13, 14, 15)

Ein statistisch hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$; 1% - Niveau) ergab sich bei der Stimulation mit Tetanustoxoid:

- | | |
|-----------------|--------------|
| - Tetanustoxoid | $p < 0,0025$ |
|-----------------|--------------|

(Abbildung 11)

In einem Parameter unterschieden sich beide Gruppen statistisch höchstsignifikant ($p < 0,001$; 1%- Niveau):

- | | |
|-------------------------------|--------------|
| - Suppressorzellaktivität MLC | $p < 0,0005$ |
|-------------------------------|--------------|

(Abbildung 12)

Bei den fünf immunologischen Parametern, bei denen sich hoch- und höchstsignifikante Unterschiede zwischen Normalprobanden und c.P.-Gesamtkollektiv ergaben, wurden nun noch Vergleiche zwischen dem Sjögren-Syndrom-Kollektiv und dem c.P.-Gesamtkollektiv gezogen. Interessanterweise gab es zwischen diesen beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede:

- Suppressorzellaktivität MLC	$p < 0,2$
- Mitogen Protein A	$p < 0,1$
- Mitogen PWM	$p < 0,2$
- Tetanustoxoid	$p < 0,25$
- Masern	$p < 0,1$

(Abbildung 10-14)

Von unseren 33 Patienten mit Sjögren-Syndrom konnte aus technischen Gründen nur bei 19 Sicca-Patienten das HLA-System bezüglich der A-, B- und C-Loci bestimmt werden. Die einzelnen HLA-Gene kamen dabei in folgender Häufigkeit vor, wobei in den Tabellen vergleichend die Werte des Normalprobandenkollektivs (n=100), die Werte der Sicca-Gruppe (n=19), sowie der Wert des relativen Risikos (rR) gegenübergestellt sind:

Tabelle 4: HLA-A - System

HLA-A	Kontrollgruppe (n=100)	Sicca-Gruppe (n=19)	rR
A 1	26%	26,3 %	1,0
A 2	44%	52,6%	1,4
A 3	31%	10,5%	0,3
A 9	19%	42,1%	3,1
A 10	8%	15,8%	2,1
A 11	11%	5,3%	0,45
A 28	5%	5,3%	1,1
A 29	8%	5,3%	0,64
Aw 30+31	4%	5,3%	1,3

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, haben HLA-A 9 positive Individuen ein dreimal, HLA-A 10 positive Individuen ein zweimal höheres relatives Risiko an c.P. mit Sjögren-Syndrom zu erkranken.

Tabelle 5: HLA-B - System

HLA-B	Kontrollgruppe (n=100)	Sicca-Gruppe (n=19)	rR
B 5	14%	15,8%	1,2
B 7	27%	31,6%	1,2
B 8	14%	15,8%	1,2
B 12	23%	10,5%	0,39
B 13	6%	10,5%	1,8
B 14	6%	0 %	0
B 15	9%	21,1%	2,7
Bw 16	9%	15,8%	1,9
B 17	5%	10,5%	2,2
B 18	7%	10,5%	1,6
B 21	1%	5,3%	5,5
Bw 22	3%	5,3%	1,8
B 27	3%	21,1%	8,6
Bw 35	20%	5,3%	0,22
B 37	4%	0 %	0
B 40	15%	5,3%	0,32
B 53	1%	0 %	0

Aus Tabelle 5 kann man entnehmen, daß HLA-B 17 positive Individuen ein 2,2 mal, HLA-B 15 Positive ein 2,7 mal, HLA-B 21 Positive ein 5,5 mal und HLA-B 27 Positive sogar ein 8,6 mal höheres relatives Risiko haben, an c.P. mit Sjögren-Syndrom zu erkranken.

Tabelle 6: HLA-C - System

HLA-C	Kontrollgruppe (n=100)	Sicca-Gruppe (n=19)	rR
Cw 1	1%	0%	0
Cw 2	4%	21,1%	6,4
Cw 3	13%	26,3%	2,4
Cw 4	19%	10,5%	0,5
Cw 5	3%	0 %	0
Cw 6	3%	0 %	0
Cw 7	3%	0 %	0

Aus Tabelle 6 geht hervor, daß HLA-Cw 2 positive Individuen ein 6,4 mal und HLA-Cw 3 Positive ein 2,4 mal höheres relatives Risiko haben, an c.P. mit Sjögren-Syndrom zu erkranken.

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 7 zeigt noch einmal unsere immunologischen Parameter in einer Synopse.

In Spalte 1 stehen die Werte, die im c.P.-Gesamtkollektiv erhöht (↑) bzw. erniedrigt (↓) waren im Vergleich zu den Normalprobanden; Spalte 2 erfaßt Unterschiede zwischen Sicca-Gruppe und Normalprobanden und Spalte 3 Sicca-Gruppe gegen c.P. Gesamtkollektiv. Ein Pfeil steht für die Signifikanz auf dem 5% - Niveau, zwei für die auf dem 1% - Niveau und drei für die auf dem 1% - Niveau. Ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, so erscheint in der Tabelle die Abkürzung "n.sig.", was "nicht signifikant" bedeutet.

Tabelle 7:

Immunolog. Parameter	c.P.-Gesamt- kollektiv ge- gen NP	Sicca-Grup- pe gegen NP	Sicca-Grup- pe gegen c.P.
SZA-Protein A	n.sig.	n.sig.	
SZA-Con A (25 µg)	↓	↓	
SZA-Con A (12,5 µg)	↓	n.sig.	
SZA-PWM	n.sig.	n.sig.	
SZA-PHA	n.sig.	n.sig.	
SZA-MLC	↓↓↓	↓↓↓	n.sig.
Mitogen Protein A	↑↑↑	↑	n.sig.
Mitogen Con A (25 µg)	n.sig.	n.sig.	
Mitogen Con A (12,5 µg)	n.sig.	↓	
Mitogen PWM	↑↑	↑	n.sig.
Mitogen PHA	n.sig.	n.sig.	
Varidase	n.sig.	n.sig.	
Tetanustoxoid	↓↓	↓↓	n.sig.
Diphtherietoxoid	n.sig.	n.sig.	
Tuberculin GT 1	↑	n.sig.	
Tuberculin GT 10	↑	n.sig.	
Vaccinia	n.sig.	n.sig.	
Masern	↑↑↑	↑	n.sig.
Rubella	↑	n.sig.	
Antigen-Cocktail	↓	↓	

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß beide Kollektive, c.P.-Gesamtkollektiv und Sicca-Gruppe, ein ähnliches immunologisches Verhalten im Vergleich zu Normalprobanden zeigen. Bei der Suppressorzellaktivität in der MLC zeigen beide Gruppen eine statistisch höchstsignifikante Erniedrigung gegenüber dem Normalprobandenkollektiv, bei Mitogen Protein A - Stimulation weisen beide Kollektive signifikante Erhöhungen auf, jedoch auf unterschiedlichem Niveau: c.P.-Gesamtkollektiv auf dem 1% - Niveau, Sicca-Gruppe nur auf dem 5% - Niveau. Bei Mitogen PWM ist das c.P.-Gesamtkollektiv auf dem 1% - Niveau, die Sicca-Gruppe nur auf dem 5% - Niveau statistisch signifikant erhöht. Bei der Stimulation mit Tetanustoxoid sind beide Kollektive auf dem 1% - Niveau statistisch signifikant erniedrigt, während sie bei Masern wieder unterschiedliches Verhalten zeigen: 1% - Niveau-Erhöhung beim c.P.-Gesamtkollektiv und lediglich 5% - Niveau-Erhöhung bei der Sicca-Gruppe.

Bei der Assoziation von HLA-Genen zu Krankheitsgruppen bedeutet ein relatives Risiko von 2, daß der Genträger ein doppelt so hohes Risiko hat, die Krankheit zu bekommen, als der Nichtgenträger, während bei relativem Risiko unter 2 ein Zusammenhang zwischen Vorkommen des Gens und einer bestimmten Krankheit nicht hergestellt werden kann. Wir geben deshalb an dieser Stelle eine Zusammenfassung von HLA-Genen, die im von uns untersuchten Kollektiv mit einem $RR > 2$ und so mit einer positiven Assoziation für die c.P. oder die c.P. mit Sjögren-Syndrom einhergehen.

Tabelle 8:

HLA	rR c.P.-Patienten	rR Sicca-Patienten
A 9	1,1	3,1
A 10	0,87	2,1
B 15	1,73	2,7
B 17	0,69	2,2
B 21	2,33	5,5
B 27	5,05	8,6
Cw 1	2,96	0
Cw 2	3,75	6,4
Cw 3	1,26	2,4

Bei allen HLA-Genen, die für eine oder für beide Gruppen ein $rR > 2$ aufweisen, läßt sich interessanterweise feststellen, daß, mit Ausnahme von Cw 1, das rR in der Sicca-Gruppe jeweils noch höher ist als in der Gruppe mit c.P.-Gesamtkollektiv.

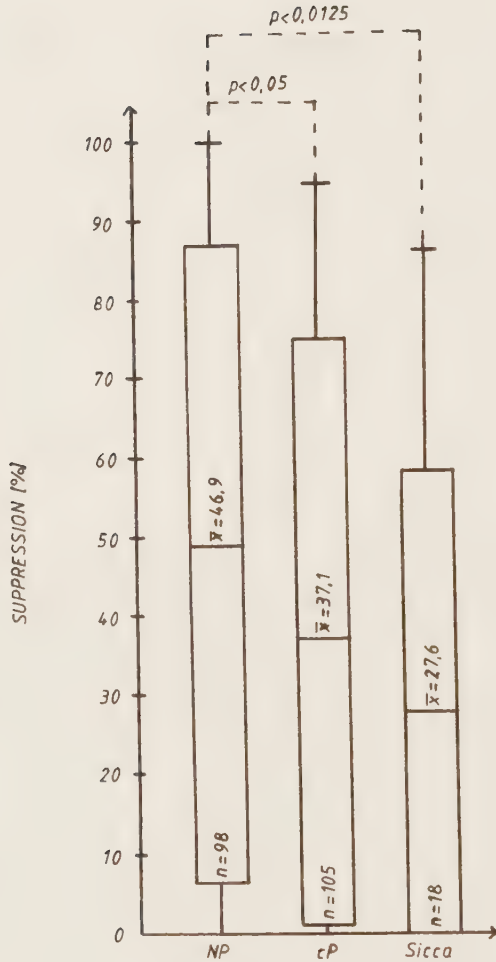


Abbildung 4: Suppressorzellaktivität-Con A (25 μ g)

Die Suppressorzellaktivität war sowohl beim c.P.-Gesamtkollektiv als auch bei der Siccagruppe statistisch signifikant erniedrigt.

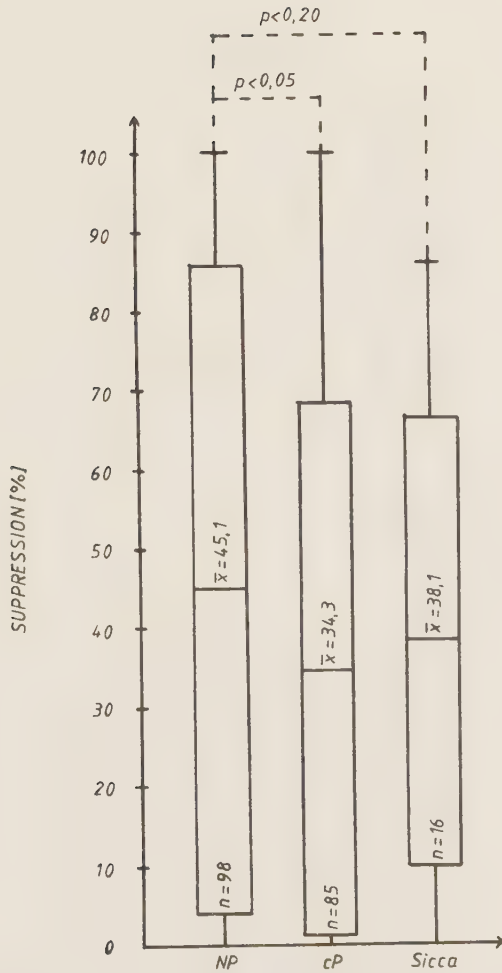


Abbildung 5: Suppressorzellaktivität-Con A (12,5 μ g)

Die Suppressorzellaktivität war beim c.P.-Gesamtkollektiv statistisch signifikant erniedrigt. Die Siccagruppe unterschied sich nicht signifikant vom Normalprobandenkollektiv.

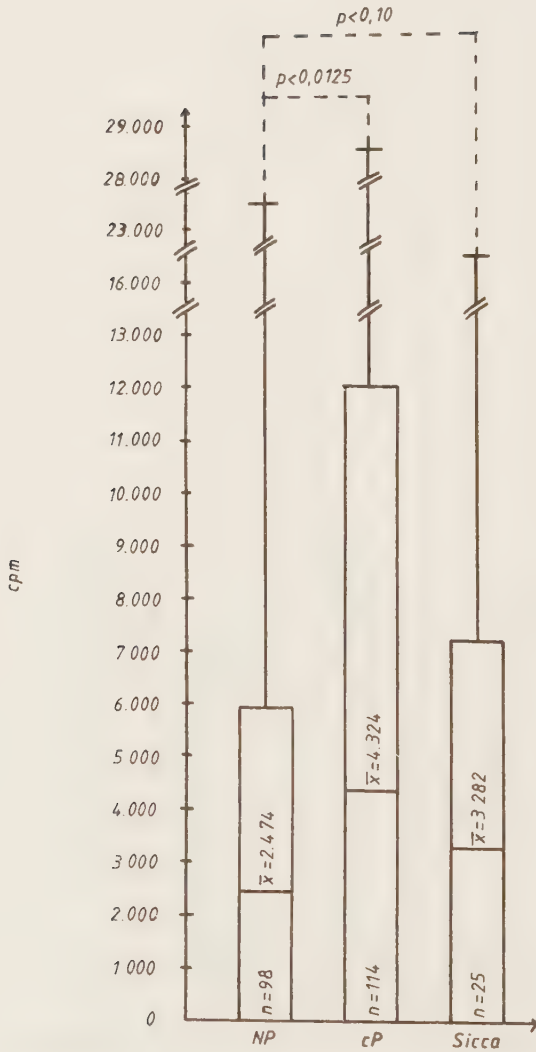
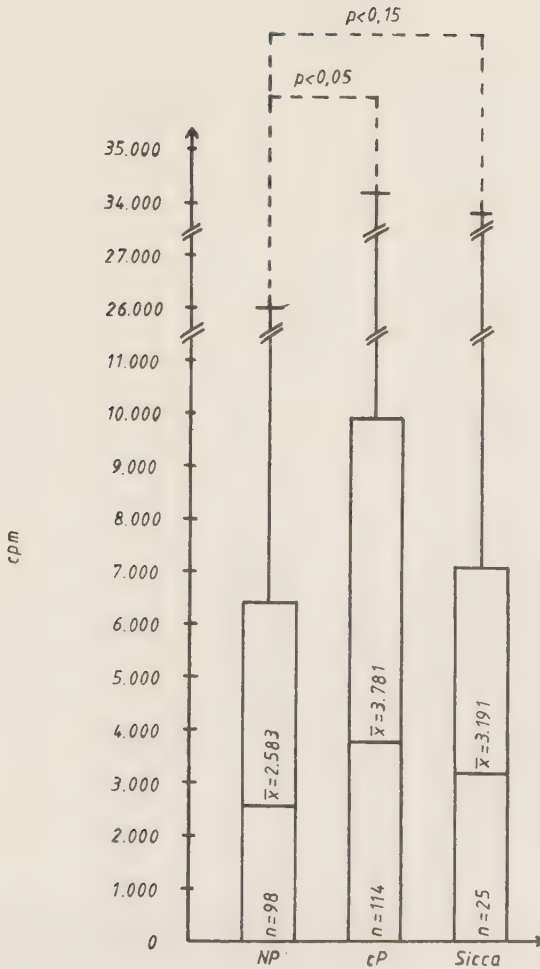


Abbildung 6: Lymphoblastopoese auf Stimulation mit Tuberculin GT 1
Die Aktivität war beim c.P.-Gesamtkollektiv statistisch signifikant erhöht. Die Siccagruppe unterschied sich nicht signifikant vom Normalprobandenkollektiv.



Abbildungung 7: Lymphoblastopoese auf Stimulation mit Tuberculin GT 10

Die Aktivität war beim c.P.-Gesamtkollektiv statistisch signifikant erhöht. Die Siccagruppe unterschied sich nicht signifikant vom Normalprobandenkollektiv.

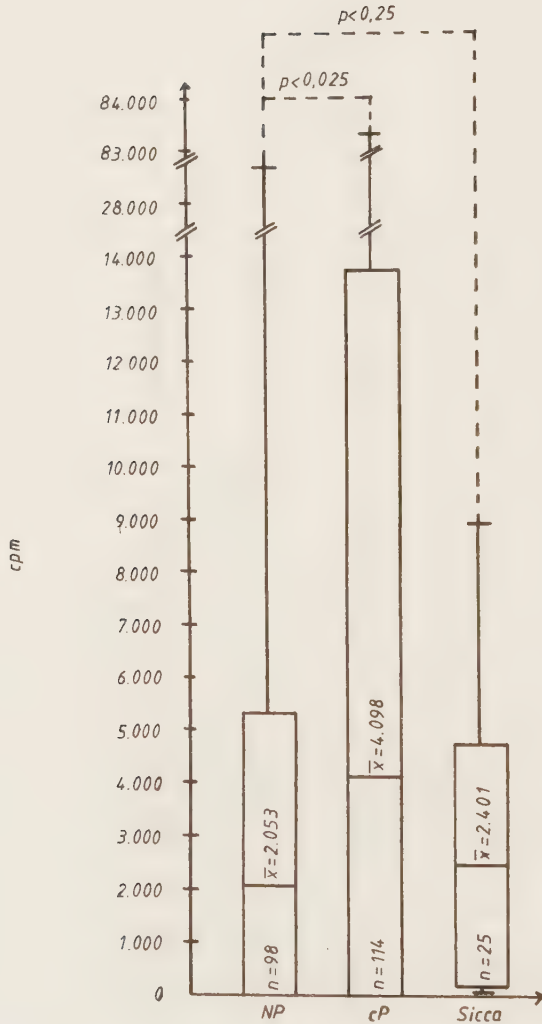


Abbildung 8: Lymphoblastopoese auf Stimulation mit Rubella-Antigen
Die Aktivität war beim c.P.-Gesamtkollektiv statistisch signifikant erhöht. Die Siccagruppe unterschied sich nicht signifikant vom Normalprobandenkollektiv.

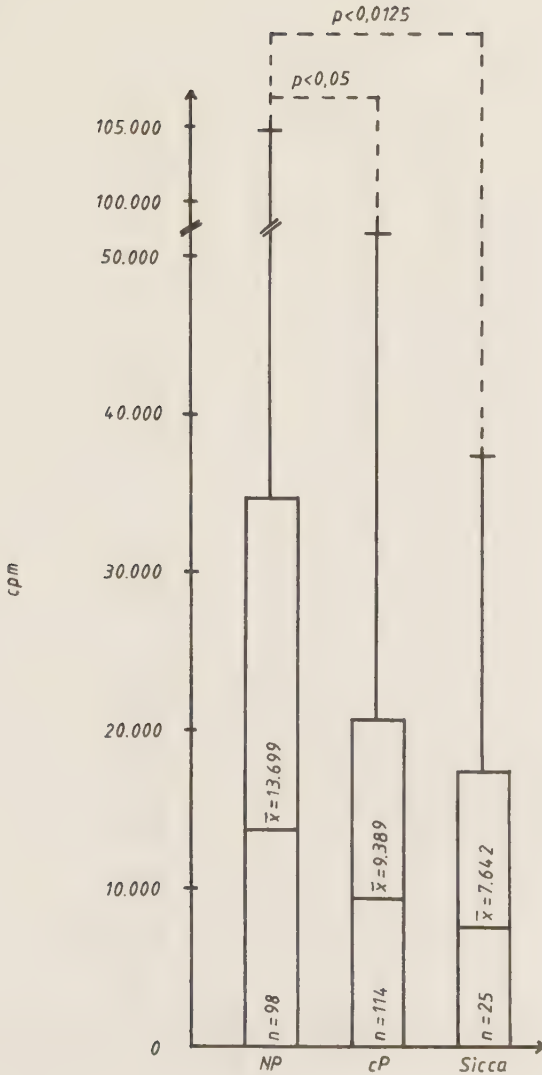


Abbildung 9: Lymphoblastopoese auf Stimulation mit Antigen-Cocktail
Sowohl das c.P.-Gesamtkollektiv als auch die Siccagruppe zeigten eine statistisch signifikant erniedrigte Aktivität.

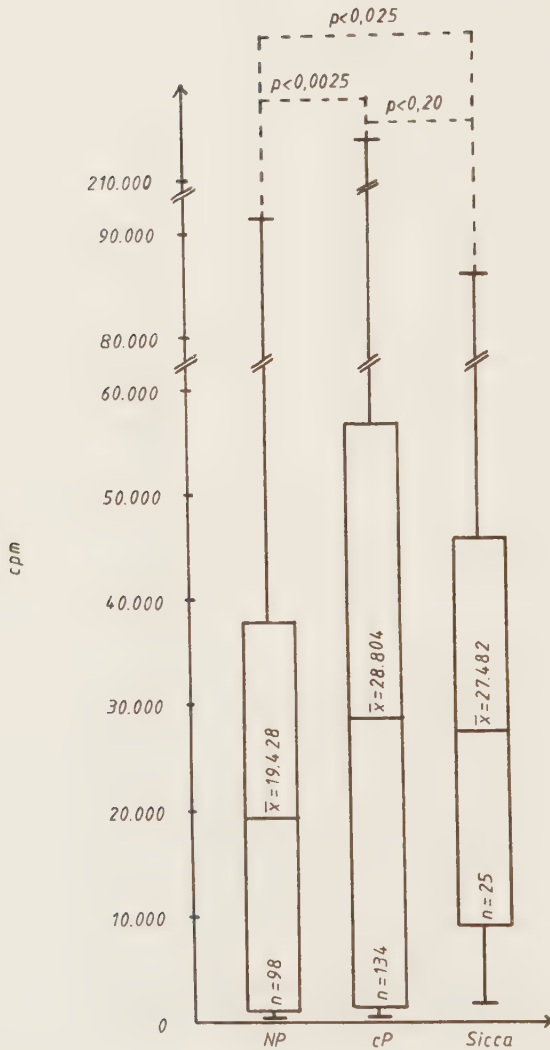


Abbildung 10: Lymphoblastopoese auf Stimulation mit Mitogen-PWM
Während das c.P.-Gesamtkollektiv statistisch hochsignifikant und die Siccagruppe statistisch signifikant erhöhte Aktivität gegenüber NP zeigten, bestand kein signifikanter Unterschied zwischen c.P.-Gesamtkollektiv und Siccagruppe.

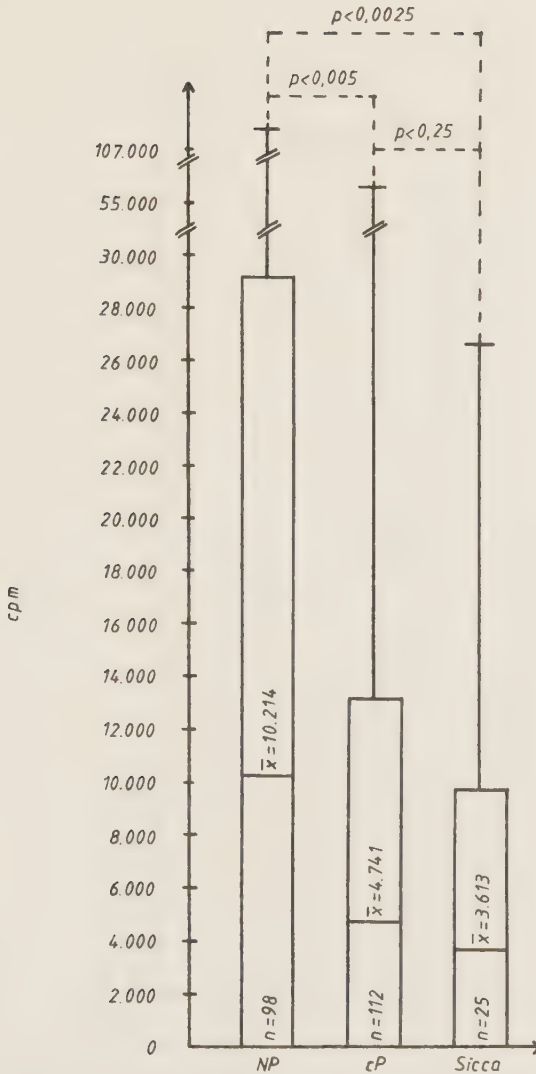


Abbildung 11: Lymphoblastopoeise auf Stimulation mit Tetanustoxoid

Sowohl das c.P.-Gesamtkollektiv als auch die Siccagruppe zeigten gegenüber NP eine statistisch hochsignifikant erniedrigte Aktivität. Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen c.P.-Gesamtkollektiv und Siccagruppe.

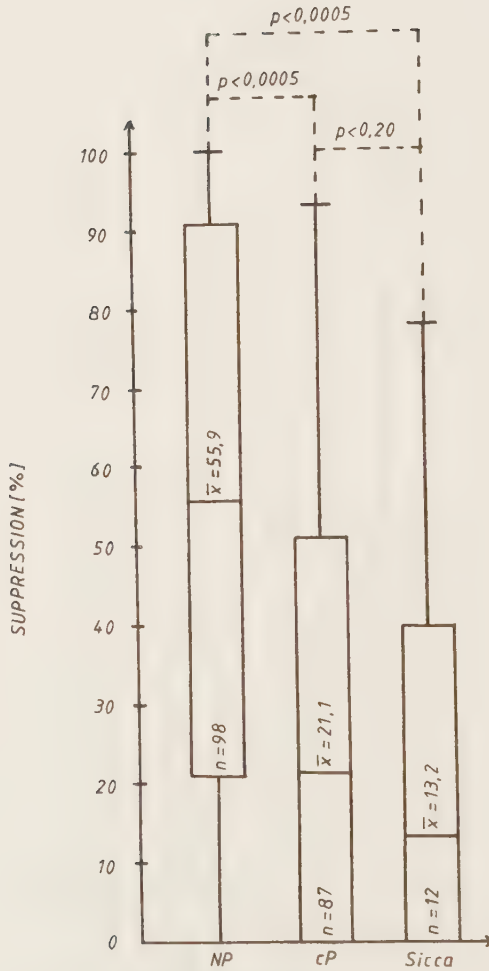


Abbildung 12: Suppressorzellaktivität in der MLC

Sowohl das c.P.-Gesamtkollektiv als auch die Siccagruppe zeigten gegenüber NP eine statistisch höchstsignifikant erniedrigte Suppressorzellaktivität. Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen c.P.-Gesamtkollektiv und Siccagruppe.

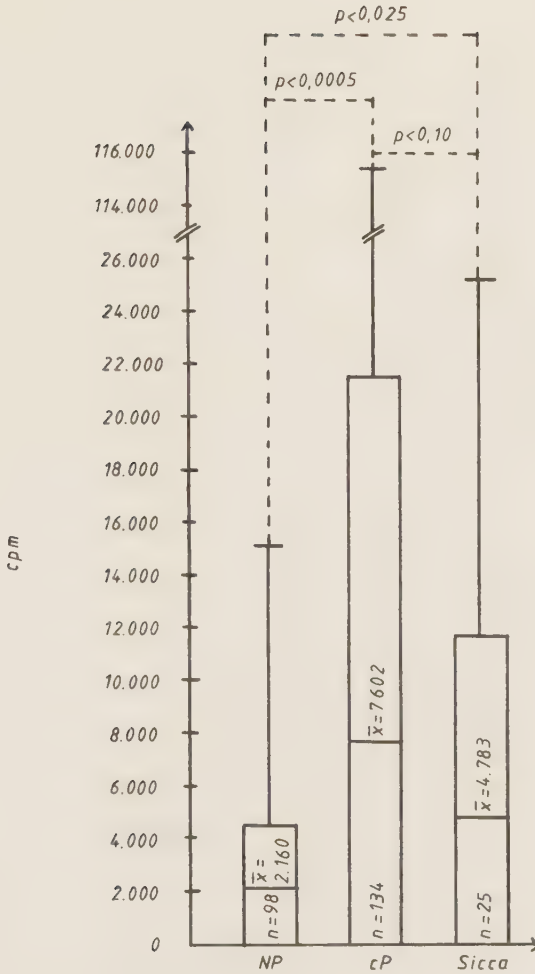


Abbildung 13: Lymphoblastopoese auf Stimulation mit Mitogen Prot.A

Das c.P.-Gesamtkollektiv zeigte eine statistisch höchstsignifikante, die Siccagruppe eine signifikante Erhöhung der Suppressorzellaktivität gegenüber NP. Unterschiede zwischen c.P.-Gesamtkollektiv und Siccagruppe waren statistisch nicht signifikant.

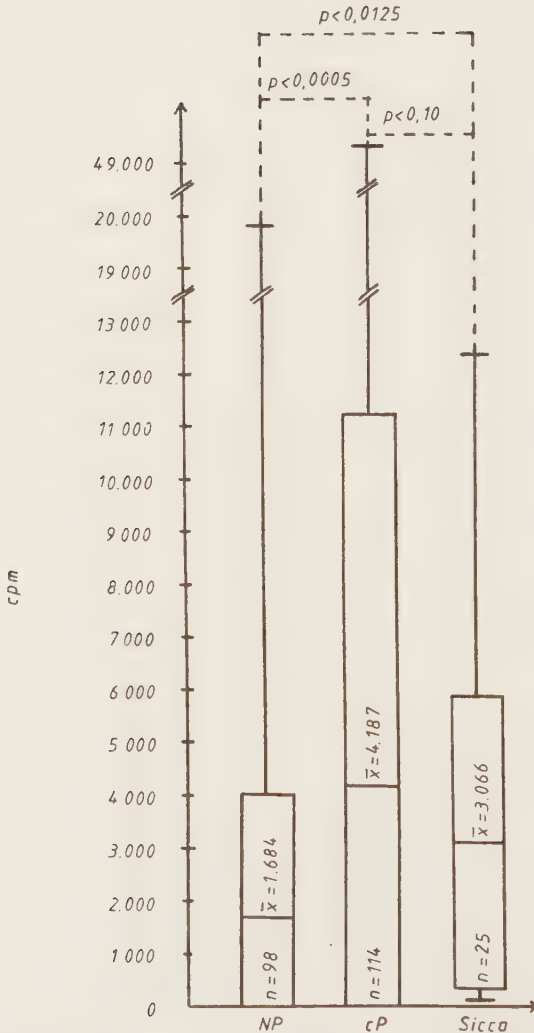


Abbildung 14: Lymphoblastopoese auf Stimulation mit Masern-Antigen
Das c.P.-Gesamtkollektiv zeigte eine statistisch höchstsignifikante, die Siccagruppe eine signifikante Erhöhung der Zellaktivität gegenüber NP. Unterschiede zwischen c.P.-Gesamtkollektiv und Siccagruppe waren statistisch nicht signifikant.

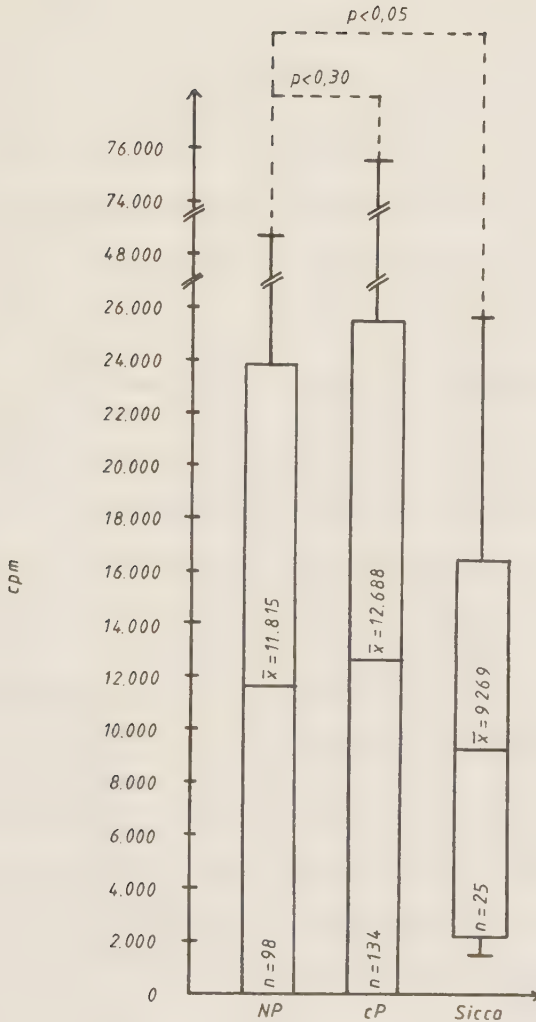


Abbildung 15: Lymphoblastopoese auf Stimulation mit Mitogen Con A (12,5 μ g)

während sich das c.P.-Gesamtkollektiv nicht signifikant vom NP-Kollektiv unterschied, zeigte die Siccagruppe eine statistisch signifikant erniedrigte Zellaktivität.

4. DISKUSSION

Entsprechend unseren Ergebnissen zeigt das c.F.-Gesamtkollektiv im Vergleich zum Normalprobandenkollektiv eine erniedrigte Suppressorzellaktivität im Concanavalin-A-System und in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC = mixed lymphocyte culture), beides Systeme, in denen vorzugsweise T-Zellen zur Stimulation kommen (143, 165, 174, 175, 192), was für eine erniedrigte Suppressorzellaktivität gegenüber T-Zellen spricht. Gleichzeitig fanden wir eine statistisch signifikant höhere Lymphoblastopoese auf Stimulation mit den Mitogenen Protein A und PWM sowie den Antigenen Tuberculin GT 1, Tuberculin GT 10, Masernantigen und Rubellaantigen. Dies spricht für erhöhte Reaktivität von T-Lymphozyten bei c.F.-Patienten im Vergleich zu Normalprobanden (77, 180, 184, 196). Obwohl auch im PWM-System ein erhöhtes Ansprechen der Lymphozyten festgestellt werden konnte, und somit Rheumatiker auch eine gegenüber Normalprobanden erhöhte B-Zell-Stimulierbarkeit zeigen (73), war die Suppressorzellaktivität im PWM-System normal. Da T-Zellen als Helferzellen in den Proliferationsprozeß der letztlichen Antikörper produzierenden B-Lymphozyten eingreifen, könnte die erhöhte B-Zell-Stimulierbarkeit durch eine erhöhte T-Helferzellaktivität im Rahmen einer insgesamt erhöhten T-Zell-Reaktivität erklärbar sein.

Trotz normaler Suppressorzellaktivität gegenüber proliferierenden B-Zellen könnte es somit in Koinzidenz mit spezifisch wirksamen pathologischen Agentien wie Bakterien oder Viren zu einer überschießenden Immunreaktion mit nicht mehr suffizient kontrollierbarer B-Zell-Proliferation bei überschießender T-Helferzell-Aktivität kommen, wobei sich die Antikörperproduktion schließlich nicht mehr gegen das pathologische Agens, sondern gegen die von ihm befallenen körpereigenen Strukturen richtet und somit autoaggressive Prozesse im Sinne einer c.P. Platz greifen. Einschränkend ist allerdings hinzuzufügen, daß z.B. die Ansprechbarkeit von Rheumatikerlymphozyten auf Tetanustoxoid, das auch T-Zellen zur Stimulation bringt (30), gegenüber Normalprobanden erniedrigt ist. Diese Einschränkung gilt auch für die Stimulation mit einem viralen Antigengemisch, das auch T-Zellen zur Stimulation bringt und in unseren Versuchen aber eine erniedrigte Reaktion ($p < 0,05$) gegenüber Normalprobanden zeigt. Auch die allerdings nicht statistisch signifikante Erniedrigung der Stimulation mit Diphtherietoxoid ($p < 0,20$), das auch B-Zellen stimuliert (134), kann als gegenwärtig für die Richtigkeit der aufgestellten Behauptung - B-Zell-Proliferation durch erhöhte T-Helferzellaktivität im Rahmen einer insgesamt erhöhten T-Zell-Reaktivität - bewertet werden.

Die erniedrigte Suppressorzellaktivität, die im c.P.-Gesamtkollektiv im Concanavalin-A-System und in der gemischten Lymphozytenkultur gefunden wurde, kann verschiedene Ursachen haben.

Zum Einen kommt eine Verminderung der Zahl der Suppressorzellen in Betracht, zum Anderen kann ein Funktionsdefekt bei normaler Anzahl der Suppressorzellen verantwortlich sein, und schließlich können diese beiden Möglichkeiten auch koexistent sein, d.h. es liegt ein Funktionsdefekt bei gleichzeitiger quantitativer Reduktion der Suppressorzellen vor (75). 1971 publizierte Fudenberg (85) seine Forschungsergebnisse, die besagten, daß alle Autoimmunkrankheiten sowie Krankheiten mit immunologischen Veränderungen durch eine gestörte Suppressorzellaktivität charakterisiert werden könnten. Des weiteren ist bekannt, daß die Suppressorzellaktivität durch Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes des Chromosoms Nr. 6 bestimmt werden kann (13). So fand sich in unserer Studie im c.P.-Gesamtkollektiv eine schwach positive Assoziation zu den HLA-Genen B 21 ($rR = 2,33$) und Cw 1 ($rR = 2,96$), sowie eine deutlich positive Assoziation zu den Genen Cw 2 ($rR = 3,75$) und B 27 ($rR = 5,05$). Träger dieser Gene haben also offensichtlich ein erhöhtes Risiko, an einer c.P. zu erkranken, was durch die genetische Determinierung der reduzierten Suppressorzellaktivität bedingt sein könnte.

Die Sjögren-Gruppe zeigt im Wesentlichen ein dem Rheumatiker-gesamtkollektiv ähnliches immunologisches Verhalten. So ist die Suppressorzellaktivität in den T-Zell-stimulierenden Systemen Concanavalin A (143, 165, 174, 175, 192) und gemischte Lamphozytenkultur signifikant bzw. höchstsignifikant erniedrigt, während die Suppressorzellaktivität im B-Zell-stimulierenden PWM-System (73) normal ist.

Ebenso scheint die Reaktivität von T-Zellen wie im Gesamtkollektiv verstärkt zu sein, wobei allerdings im Gegensatz zum Gesamtkollektiv die T-Lymphozyten nur im Protein A-System (184) und gegenüber Masernantigen (180) verstärkt reagierten, wogegen die Reaktion gegen Tuberculin GT 1, Tuberculin GT 10 (77) und Rötelnantigen (196) normal war. Wie das Gesamtkollektiv zeigt auch das Sicca-Kollektiv eine erniedrigte Reaktivität gegenüber dem T-Zell-stimulierenden Tetanustoxoid (30), sowie gegenüber dem T-Zell-stimulierenden viralen Antigen-Cocktail. Diese Ähnlichkeit im immunologischen Verhalten der Sicca-Gruppe im Vergleich zum c.P.-Gesamtkollektiv wird bestärkt durch den direkten Vergleich der beiden Gruppen, den wir, wie im Ergebnisteil beschrieben, bei den immunologischen Parametern durchführten, bei denen sich hoch- und höchstsignifikante Unterschiede zwischen c.P.-Gesamtkollektiv und Normalprobanden ergaben. In all diesen fünf Parametern konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen c.P.-Gesamtkollektiv und Sicca-Gruppe festgestellt werden. Somit gelten für die Patienten mit Sicca-Syndrom die Überlegung bezüglich des immunologischen Verhaltens in Analogie zur c.P.-Gesamtgruppe. Daß die Signifikanzunterschiede zwischen Sicca-Gruppe und Normalprobanden nicht so deutlich ausfielen wie bei der Rheumatikergruppe könnte darin begründet sein, daß die Sicca-Gruppe mit $n = 33$ wesentlich kleiner war als das c.P.-Gesamtkollektiv mit $n = 234$. Möglicherweise hätten sich bei einer größeren Sicca-Gruppe deutlichere Ergebnisse, so wie sie in der Rheumatikergruppe auftraten, ergeben.

Da also das immunologische Verhalten der Sicca-Gruppe im Wesentlichen der c.P.-Gruppe ähnelt, kann der Schluß gezogen werden, daß das immunologische Verhalten der Patientengruppe c.P. mit Sjögren-Syndrom durch das Vorhandensein der c.P. und nicht durch das begleitende Sjögren-Syndrom geprägt wird. Somit bleibt offen, was sich für ein immunologisches Verhalten bei einem Patientenkollektiv mit primärem Sjögren-Syndrom, d.h. bei Patienten mit Sjögren-Syndrom allein ohne eine begleitende Autoimmunkrankheit (144) wie in unserem Fall die c.P., ergeben würde. Dies zu erforschen war nicht das Ziel dieser Studie und wäre ein interessantes Gebiet für weitere Untersuchungen.

Anders verhält es sich mit dem immungenetischen Verhalten, denn hier konnten wir einen Unterschied zwischen c.P.-Gruppe und Sicca-Gruppe feststellen. Im Sjögren-Kollektiv fand sich eine schwach positive Assoziation zu den HLA-Genen A 10 ($rR = 2,1$) B 15 ($rR = 2,7$), B 17 ($rR = 2,2$) und Cw 3 ($rR = 2,4$) sowie eine stark positive Assoziation zu den HLA-Genen A 9 ($rR = 3,1$), B 21 ($rR = 5,5$), B 27 ($rR = 8,6$) und Cw 2 ($rR = 6,4$). Somit zeigt sich eine Anhäufung von Patienten, die die HLA-Gene B 21, B 27 und Cw 2 tragen in der Gruppe der Sicca-Patienten. Dies kann jedoch durch die relativ kleine Zahl von Sicca-Patienten mit HLA-Typisierung ($n=19$) im Vergleich zu den c.P.-Patienten mit HLA-Typisierung ($n=171$) bedingt sein; bei einer in der Zahl dem c.P.-Gesamtkollektiv angeglichenen Sicca-Gruppe wäre ein Verschwinden dieser Anhäufung durchaus denkbar.

Im Gegensatz zum c.P.-Gesamtkollektiv zeigt sich in der Sicca-Gruppe eine stark positive Assoziation zum HLA-A 9 ($rR = 3,1$), das zum c.P.-Gesamtkollektiv normal assoziiert ist ($rR = 1,1$).

Das HLA-A 9, das somit keine positive Assoziation zur c.P. zeigt, scheint somit, sofern es bei Probanden mit c.P. vorkommt, das Auftreten eines Sjögren-Syndrom zu begünstigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

33 Patienten mit c.P. und Sjögren-Syndrom sowie 234 Patienten mit c.P. wurden immungenetisch (HLA-Gene) und immunfunktionell, (Mito- und Antigen-Stimulation, Suppressorzellaktivität) untersucht und mit 100 Normalprobanden verglichen. In beiden Patientengruppen war die Suppressorzellaktivität im Concanavalin-A-System und in der gemischten Lymphozytenkultur signifikant erniedrigt. Die Lymphozytenstimulierbarkeit war in beiden Kollektiven im Protein-A-System, im PWM-System sowie mit Masernantigen signifikant erhöht, während bei der Stimulation mit Tuberculin GT 1, Tuberculin GT 10 und Rubellaantigen nur die Rheumatikergruppe mit erhöhter Lymphozytenstimulierbarkeit reagierte und die Sicca-Gruppe gegenüber Normalprobanden normales Verhalten zeigte. Verminderte Immunantwort zeigten beide Gruppen gegen Tetanustoxoid und ein virales Antigengemisch. Immunfunktionell zeigten somit beide Gruppen ein im Wesentlichen gleiches Verhalten.

Bei der immungenetischen Untersuchung ergab sich in beiden Gruppen eine stark positive Assoziation zu den HLA-Genen B 21 (rR: c.P.-Gruppe 2,2; Sicca-Gruppe 5,5), B 27 (rR: c.P.-Gruppe 5,05; Sicca-Gruppe 8,6) und Cw 2 (rR: c.P.-Gruppe 3,75; Sicca-Gruppe 6,4) mit einer Häufung dieser Genträger in der Sicca-Gruppe. Während in der c.P.-Gruppe eine normale Assoziation zum HLA-A 9 auftrat (rR = 1,1), zeigte sich zu diesem Gen in der Sicca-Gruppe eine stark positive Assoziation (rR = 3,1).

Das Auftreten des HLA-A 9 Genes scheint somit, sofern es bei Probanden mit c.P. vorkommt, das Auftreten eines Sjögren-Syndroms zu begünstigen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdou, N., Lindsley, W.B., Rasela, L.S.: Suppressor T-cell dysfunction and anti-suppressor cell activity in active early rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 8, 9 (1981)
2. Abdou, N.I., Pascual E., Racela, L.S.: Suppressor T-cell dysfunction and anti-suppressor T-cell antibody in active early rheumatoid arthritis (abstract). Arthritis Rheum. 22, 586 (1974)
3. Ackroyd, J.F.: Thrombocytopenic purpura due to drug hypersensitivity. In: "Sensitivity Reactions to Drugs". Hrsg.: Rosenheim, M.L. und Moulton, R., Blackwell, Oxford (1958)
4. Adler, C.P., Benecke, G.: Störungen der Fortbewegungsorgane. In: Sandritter, Beneke (Hrsg.), Allgemeine Pathologie. Schattauer Verlag, Stuttgart S. 702 (1974)
5. Albrecht, H.J.: Rheumatologie für die Praxis. S. Karger Verlag, Basel (1979)
6. Alspaugh, M.A., Jonson, F.G., Robin, H. and Tan, E.M.: Lymphocytes transformed by Epstein Barr virus. Induction of nuclear antigen reactive with antibody in rheumatoid arthritis. J. Exp. Med. 148, 1018 (1978)

7. Anderson, J.R., Gray, K.G., Beck, J.S.: Precipitating autoantibodies in the connective tissue diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 21, 360 (1962)
8. Ball, J., Lawrence, J.S.: Epidemiology of the sheep cell agglutination test. *Ann. Rheum. Dis.* 20, 235 (1961)
9. Bankhurst, A.D., Husby, G., Williams, R.C.: Predominance of T-cells in the lymphocytic infiltrates of synovial tissues in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 19, 555 (1976)
10. Barnett, E.V., Winkelstein, A., Weinberger, H.J.: Agammaglobulinemia with polyarthritis and subcutaneous nodules. *Amer. J. Med.* 48, 40 (1970)
11. Beck, J.S., Anderson, J.R., Bloch, K.J.: Antinuclear and precipitating autoantibodies in Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 24, 16 (1965)
12. Behrend, T., Lawrence, J.S.: Die Epidemiologie der rheumatischen Erkrankungen. In: Blohmke, M., Ferber, Ch. von Kisker, K.P., Schäfer, H. (Hrsg.), *Handbuch der Sozialmedizin Bd. 2, Epidemiologie und präventive Medizin*. Enke Verlag, Stuttgart (1977)
13. Benacerraf, B.: Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212, 1229 (1981)

14. Beneke, F.: Allgemien Pathologie der Interzellulärsubstanz.
In: Sandritter, Beneke (Hrsg.), allgemeine Pathologie.
Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 279 (1974)
15. Bennet, P.H., Wood, P.H.H.: Recommendations population
studies of the rheumatic diseases 435. Excerpta Medica
Foundation, Amsterdam, (1968)
16. Bergmann, K.Ch., Jaster, D.: Nachweis eines synovialty-
pischen Proteins bei rheumatoider Arthritis. Z. Rheuma-
forschung. 29, 198 (1970)
17. Bertram, U.: Xerostomia. Clinical aspects, pathology and
pathogenesis. Acta. Odont. Scand. 25, Suppl. 49, (1967)
18. Bertram, U., Halberg, P.: A specific antibody against the
epithelium of the salivary ducts in sera from patients
with Sjögren's syndrome. Acta. Allerg. 19, 458 (1964)
19. Biberfeld, G., Nilsson, E., Biberfeld, P.: T-lymphocyte
subpopulations in synovial fluid of patients with rheuma-
tic disease. Arthritis and Rheumatism, 22, 978 (1979)
20. Blanden, R.V., Doherty, P.C., Dunlop, M.B.C., Gardner, I.
D., Zinkernagel, R.M., David, C.S.: Genes required for T-
cell mediated cytotoxicity against virus-infected target
cells are in the K or D regions of the H-2 gene complex.
Nature 254, 269 (1975)

21. Bloch, K.J., Buchanan, W.W., Wohl, M.J.: Sjögren's syndrome: A clinical, pathological and serological study of sixty-two cases. *Medicine* 44, 187 (1965)
22. Bloch, K.J., Bunim, J.J.: Sjögren' syndrome and its relation to connective tissue diseases. *J. Chron. Dis.* 16, 915 (1963)
23. Bodmer, w.F., Batchelor, J.R., Bodmer, J.G., Festenstein, H., Morris, P.J.: *Histocompatibility Testing*, 1977. Copenhagen, Munksgaard (1978)
24. Böhm, A.: Über den Sjögreschen Symptomenkomplex Münch. *Med. wschr.* 92, 955 (1950)
25. Bokisch, V.A., Müller-Eberhard, H.J. Cochrane, C.G.: Isolation of fragment (C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemottractic activity and description of an anaphylatoxin inactivator of human serum. *J. exp. Med.* 129, 1109
26. Boyum, A.: Separation of leucocytes from blood and bone marrow *Scand. J. clin. lab. Invest.* 21, Suppl. 97, 1 (1968)
27. Brackertz, D.: *Chronische Polyarthrititis*. Euler-Verlag, Basel (1980)

28. Brackertz, D., Hagmann, J., Kueppers, F.: Proteinase inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 34, 225 (1975)
29. Brackertz, D., Küppers, F., Müller, W.: Demonstration and partial characterization of a protein in synovial fluid and its possible meaning. In "Rheumatoid Arthritis. Pathogenic Mechanismus and Consequences in Therapeutics". Academic. Press, London, p 261 (1971)
30. Broff, M.D., Jonsen, M.E., Geha, R.S.: Nature of the immunogenic moiety recognized by the human T-cell proliferating in response to tetanus toxoid antigen. *Eur. J. Immunol.* 11, 365 (1981)
31. Buisseret, P.D., Pembrey, M.E., Lessof, M.H.: α 1-Antitrypsin phenotypes in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 11, 1358 (1977)
32. Bunim, J.J., Burch, T.A., O'Brien, W.M.: Influence of genetic and environmental factors on the occurrence of rheumatoid arthritis and rheumatoid factor in American Indians. *Bull. Rheum. Dis.* 15, 349 (1964)
33. Burch, T.A., O'Brien, W.M., Bunim, J.J.: Family and genetic studies of rheumatoid arthritis and rheumatoid factor in Blackfeet Indians. *Amer. J. publ. Hlth.* 54, 1184 (1964)

34. Bywaters, E.G.L.: The relation between heart and joint disease including "rheumatoid heart disease" and "chronic Post-rheumatic arthritis (Type Jaceoud)". Brit. Heart J. 12 (1950)
35. Gabanel, G., Voog, R., Stefani, D., Gros Lambert, P., Marchal, A.: Polyarthrititis rheumatoid de l'adulte révélatrice d'une agammaglobulinémie. Sem. Hosp. 45, 3034 (1969)
36. Cantor, H. Asofsky, R.: Synergy among lymphoid cells mediating the graft-vs-host response. II. Synergy in graft-vs-host reactions produced by BALB/c lymphoid cells of differing anatomic origin. J. Exp. Med. 131, 235 (1970)
37. Cantor, H., Boyse, E.A.: Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. 2. Cooperation between subclasses of Ly^+ cells in the generation of killer activity. J. Exp. Med. 141, 1390 (1975)
38. Cantor, H., Simpson, E.: Regulation of the immune response by subclasses of T-lymphocytes. I. Interactions between pre-killer T-cells and regulatory T-cells obtained from peripheral lymphoid tissues of mice. Eur. J. Immunol. 5, 330 (1975)
39. Cardella, C.J., Davies, P., Allison, A.C.: Immune complexes induce selective release of lysosomal enzymes. Nature 247, 46 (1974)

40. Castor, C.W.: Connective tissue activation II. Abnormalities of cultured rheumatoid synovial cells. *Arthritis Rheum.* 14, 55 (1971)
41. Castor, C.W., Dorstewitz, E.L.: Abnormalities of connective tissue cells cultured from patients with rheumatoid arthritis. *J. Lab. clin. Med.* 68, 300 (1966)
42. Castor, C.W., Lewis, R.B.: Connective tissue activation. X. Current studies of mediators and the process. *Scand. J. Rheumatol.* 5, 41 (1975)
43. Castor, C.W., Ritchie, J.C., Scott, M.E., Whitney, S.L.: Connective tissue activation. XI. Stimulation of glycosaminoglycan and DNA formation by a platelet factor. *Arthritis Rheum.* 20, 859 (1977)
44. Cats, A., Hazevoet, H.M.: Significance of positive tests for rheumatoid factor in the prognosis of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 29, 254 (1970)
45. Chandler, R.W., Robinson, H., Masi, A.T.: Serological investigations for evidence of an infectious etiology of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 30, 274 (1971)
46. Claman, H.N., Chaperon, E.A., Triplett, R.F.: Immunocompetence of transferred thymus-marrow cell combinations. *J. Immunol.* 97, 828 (1966)

47. Cochrane, W., Davies, D.V., Dorleng, J., Bywaters, E. G.L.: Ultramicroscopic structures of the rheumatoid nodule. *Ann. Rheum. Dis.* 23, 345 (1964)
48. Cole, G.A., Nathanson, N.: Lymphocytic choriomeningitis pathogenesis. *Progr. Med. Virol.* 18, 94 (1975)
49. Cole, G.A., Nathanson, N., Prendergast, R.A.: Requirement for O Bearing cells in lymphocytic choriomeningitis virus-induced central nervous system disease. *Nature* 238, 335 (1972)
50. Cone, R.E., Feldmann, M., Marchalones, J.J., Nossal, G. J.V.: Cytophilic properties of surface immunoglobulin of thymus-derived lymphocytes. *Immunology* 26, 49 (1974)
51. Conn, D.L., Schroeter, A.L., McDuffie, F.C.: Cutaneous vessel immune deposits in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 19, 15 (1976)
52. Cooke, T.D., Hurd, E.R., Jasin, H.E.: Identification of immunoglobulins and complement in rheumatoid articular collagenous tissues. *Arthritis Rheum.* 18, 563 (1975)
53. Cooke, T.D., Hurd, E.R., Ziff, M., Jasin, H.E.: The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. II. Preferential localization of antigen-antibody complexes to collagenous tissues. *J. Exp. Med.* 135, 323 (1972)

54. Cooper, M.D., Peterson, R.D.A., Good, R.A.: Delineation of thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. Nature 205, 143 (1965)
55. Cooper, M.D., Peterson, R.D.A., South, M.A., Good, R.A.: The functions of the thymus systems and the bursa system in the chicken. J.Exp. Med. 123, 75 (1966)
56. Coutelle, C., Rath, F.W., Die Bewegungsorgane. In: Kettler, L.H. (Hrsg.), Lehrbuch der speziellen Pathologie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, S. 893 (1976)
57. Cox, D.W., Huber, O.: Rheumatoid arthritis and α_1 -anti-trypsin. Lancet 1, 1216 (1976)
58. Crews, S.J., Whitfield, A.G.W.: Sjögren's syndrome Postgrad. Med. J. 39, 324 (1963)
59. Dausset, J.: Iso-leuco-anticorps. Actahaemat. 20, 156 (1958)
60. Dausset, J.: Leuco-agglutinins. Vox sang. 4, 190 (1954)
61. Davies, D.V.: The anatomy and physiology of joint. In: Copeman, W.S.C., Textbook of the rheumatic disease. Livingstone, Edinburgh, London (1964)
62. Dayer, J.M., Krane, S.M.: The interaction of immunocompetent cells and chronic inflammation as exemplified by rheumatoid arthritis. Clin. Rheum. Dis. 4, 517 (1978)

63. Dayer, J.M., Robinson, D.R., Krane, S.M.: Prostaglandin production by rheumatoid synovial cells stimulation by a factor from human mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 145, 1393 (1977)
64. Dayer, J.M., Russell, R.G.G., Krane, S.M.: Collagenase production by rheumatoid synovial cells: Stimulation by a human lymphocyte factor. *Science* 135, 181 (1977)
65. De Blécourt, J.J.: Epidemiologische und Erbliehkeitsuntersuchungen bei rheumatischen Erkrankungen, insbesondere rheumatoider Arthritis (R.A.) und Spondylitis ankylopoetica (Sp.A.) *Z. Rheumaforschg.* 22, 413 (1963)
66. De Blécourt, J.J., Boerma, F.W., Vorencamp, E.O.: Rheumatoid arthritis (R.A.) factor in near relatives of sero-positive and sero-negative patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 21, 339 (1962)
67. Decker, J.L., Barden, J.A.: *Mycoplasma arthritis* in the pig. In Dumonde, D.D. (ed.): *Infection and immunology in the rheumatic diseases*. Oxford, Blackwell Scientific Publications. (1976)
68. DeHoratius, R.J., Abruzzo, J.L., Williams, R.C.: Immunofluorescent and immunologic studies of rheumatoid lung. *Arch. Intern. Med.* 129, 441 (1972)

69. Denko, C.W., Bergensthal, D.M.: The Sicca syndrome. A study of sixteen cases. *Arch. Intern. Med.* 105, 849 (1960)
70. DeVries, R.R.P., Kreeftenberg, H.G., Loggen, H.G., van Rood, J.J.: In vitro immune responsiveness to Vaccinia virus and HLA. *N. Eng. J. Med.* 297, 692 (1977)
71. Dias Da Silva, W., Eisele, J.W., Lepow, I.H.: Complement as a mediator of inflammation. *J. Exp. Med.* 126, 1027 (1967)
72. Dobloug, J.W., Chattopadhyay, C., Forre, O.: Con A-induced suppressor cell activity and T-lymphocyte subpopulations in peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 15, 367 (1981)
73. Dutton, R.W.: Inhibitory and stimulatory effects of Concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspensions to antigen. *J. Exp. Med.* 136, 1445 (1972)
74. Eckstein, R., Mempel, W., Bolte, H.-D.: Reduced suppressor-cell activity in congestive cardiomyopathy and in myocarditis. *Circulation* 65/6, 1224 (1982)
75. Eckstein, R., Mempel, W., Heim, M., Bolte, H.-D.: The role of human leukocyte antigen genes and low suppressor cell activity in the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. In: Bolte (Hrsg.) *Viral Heart Disease*. Springer Verlag, Berlin, p 150 (1984)

76. Edwards, J.H.: HL-A and disease. The detection of associations. *J. Immunogenet.* 1, 249 (1974)
77. Ellner, J.J., Schacter, B.Z., Bhe, F.T.: Tuberculin response of lymphocytes from human skin test non-reactors: Evidence for in vitro primary sensitization of T-lymphocytes. *Cell. Immunol.* 45, 213 (1979)
78. Erb, P.M., Feldmann, M.: The role of macrophages in the generation of T-helper-cells.II. The genetic control of the macrophage T-cell interaction for helper cell induction with soluble antigens. *J. Exp. Med.* 142, 460 (1975)
79. Erdös, E., Yang, H.Y.T.: Kinases. In "Bradykinin, Kallidin and Kallikrein", *Handbook of Experimental Pharmacology.* Springer Verlag, Heidelberg, p 289 (1970)
80. Evanson, J.M., Jeffrey, J.J., Krane, S.M.: Studies on collagenase from rheumatoid synovium in tissue culture. *J. Clin. Invest.* 47, 2639 (1968)
81. Feldmann, M., Basten, A.: Cell interactions in the immune response in vitro. III. Specific collaboration across a cell impermeable membrane. *J. Exp. Med.* 136, 49 (1972)
82. Feltkamp, T.E., Van Rossum, A.L.: Antibodies to salivary duct cells, and other autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome and other idiopathic autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immun.* 3, 1 (1968)

83. Ferlmann, P., Nilsson, H., Leon, M.A.: Inhibition of cytotoxicity of lymphocytes by Concanavalin A in vitro. Science (Wash. D.C.) 168, 1112 (1970)
84. Fish, A.J., Michael, A.F., Gewurz, H., Good, R.A.: Immunopathologic changes in rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum. 9, 267 (1966)
85. Fudenberg, H.H.: Genetically determined immune deficiency as the predisposing cause of "autoimmunity" and lymphoid neoplasia. Am.J. Med. 51, 295 (1971)
86. Gajdusek, D.C.: Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. Science 197, 943 (1977)
87. Gardner, D.L.: The pathology of rheumatoid arthritis. Arnolds, London (1972)
88. Gershon, R.K.: Disquisition on suppressor T-cells. Transplant. Rev. 26, 170 (1975)
89. Gershon, R.K.: T-cell control of antibody production. Contemp. Topics Immunobiol. 3, 1 (1974)
90. Ghadially, F.N., Roy, S.: Ultrastructure of synovial joints in health and disease. Butterworths, London (1969)

91. Gilliland, B.C., Mannik, M.: Rheumatoid Arthritis. In: Isselbacher, Adams, Braunwald, Petersdorf, Wilson (Hrsg.), Harrison's Principles of Internal Medicine. Mc Graw-Hill Kogakusha, Tokyo, p 1872 (1980)
92. Glynn, L.E.: Heberden Oration. The chronicity of inflammation and its significance in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 27, 105 (1968)
93. Godenberg, A., Singer, J.M., Plotz, C.M.: Hereditary factors in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 3, 446 (1960)
94. Goldmann, Sch.F.: Das Haupthistokompatibilitätssystem und die Genetik der Zuckerkrankheit. Deutsch. Ärztebl. 79/17, 45 (1982)
95. Good, R.A., Rötstein, J., Mazzitello, W.F.: The simultaneous occurrence of rheumatoid arthritis and agammaglobulinemia. J. Lab. Clin. Med. 49, 343 (1967)
96. Grayzel, A.I., Beck, C.: Rubella infection of synovial cells and the resistance of cells derived from patients with rheumatoid arthritis. J. Exp. Med. 131, 367 (1970)
97. Greenberg, L.J., Gray, E.D., Yunis, E.J.: Association of HL-A 5 and immune responsiveness in vitro to streptococcal antigens. J. Exp. Med. 141, 935 (1975)

98. Grimley, P.M., Sokoloff, L.: Synovial giant cells in rheumatoid arthritis. *Am. J. Clin. Pathol.* 49, 931 (1966)
99. Haldane, J.B.S.: The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann. Human. Genet.* 20, 309 (1955)
100. Harris, E.D., Jr., Faulkner, C.S., Brown, F.F.: Collagenolytic systems in rheumatoid arthritis. *Clin. Orthop.* 110, 303 (1975)
101. Hartmann, F.: Erkrankungen der Gelenke. In: Gross, Schölmacher (Hrsg.), *Lehrbuch der Inneren Medizin*, Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 968 (1977)
102. Hartmann, F., Deicher, H.: Bindegewebe. In: Siegentahler (Hrsg.), *Klinische Pathophysiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 882 (1973)
103. Harwald, B., Hauge, M.: Hereditary factors elucidated in twin studies. In "Genetics and the epidemiology of chronic diseases". Publication Nr. 1163 H.S. Couvernment Printing Office, Washington, D.C., p 61 (1965)
104. Heaton, A.M.: Sjögren's syndrome. *Proc. Roy. Soc. Med.* 55, 479 (1962)
105. Heaton, J.M.: Sjögren's syndrome and systemic Lupus erythematosus. *Brit. Med. J.* 1, 466 (1959)

106. Hedberg, H.: Studies on synovial fluid in rheumatoid arthritis. The total complement activity. Acta. Med. Scand. Suppl. 479, 1 (1967)
107. Helenius, A., Morein, B., Fries, E., Simon, K., Robinson, P., Schirrmacher, V., Terhorst, C., Strominger, J. L.: Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 3846 (1978)
108. Hollingsworth, J.W., Siegel, E.R., Dreasy, W.A.: Granulocyte survival in synovial exsudate of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory joint diseases. Yale J. Biol. Med. 39, 289 (1967)
109. Holm, S.: Keratoconjunctivitis sicca and the sicca syndrome. Acta. Ophtal. Suppl. 33, 1 (1949)
110. Horton, J.F., Oppenheim, J.J., Mergenhagen, S.E.: Macrophage lymphocyte synergy in the production of osteoclast activating factor. J. Immunol. 113, 1278 (1974)
111. Hotchin, J.: Persistent and slow virus infections. Monog. Viral. 3, 1 (1971)
112. Hurd, E.R., Kinsella, T.D., Ziff, M.: Immunohistologic studies of synoviocytes and synovial exsudate cells. J. Exp. Med. 134, 296 (1971)

113. Information der deutschen Rheumaliga e.V. 2: Die Deutsche Rheumaliga stellt sich vor. (1976)
114. Jasin, H.E., Lo Spalluto, J.J., Liff, M.: Rheumatoid hyperviscosity syndrome. Am. J. Med. 49, 484 (1970)
115. Jones, B.R.: Lacrimal and salivary precipitating antibodies in Sjögren's syndrome. Lancet 2, 773 (1958)
116. Kar, N.C., Cracchiolo, A., Mirra, J., Pearson, C.M.: Acid neutral and alkaline hydrolases in arthritic synovium. Am. J. clin. Pathol. 65, 220 (1976)
117. Katz, D.H., Benacerraf, B.: The regulatory influence of activated T-cells on B-cell responses to antigen. Adv. Immunol. 15, 1 (1972)
118. Katz, D.H., Hamaoka, T., Dorf, M.E., Benacerraf, B.: Cell interaction between histoincompatible T- and B-lymphocytes. The H-2 gene complex determines successful physiologic lymphocyte interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 2624 (1973).
119. Keystone, E.C., Gladman, D.D., Buchanan, R., Cane, D., Poplinski L.: Impaired antigen-specific suppressor cell activity in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 23, 246 (1980)

120. Kimura H., Tateishi, H., Ziff. M.: Surface ultrastructure of rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 20, 1085 (1977)
121. Kindred, B., Shreffler, D.C.: H-2 dependence of cooperation between T- and B-cells in vivo. *J. Immunol.* 109, 940 (1972)
122. Kinsella, T.D., Baum, J., Ziff. M.: Studies of isolated synovial lining cells of rheumatoid and non-rheumatoid synovial membranes. *Arthritis Rheum.* 13, 734 (1970)
123. Kobayashi J., Ziff. M.: Electron microscopic studies of lymphoid cells in the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 16, 471 (1973)
124. Korn, J.H., Halushka, P.V., LeRoy, E.C.: Suppression of growth and the phenotypic expression of fibroblasts by peripheral blood mononuclear cell supernatants: A role for prostaglandins. *Arthritis Rheum.* 21, 571 (1979)
125. Kulka, J.P., Bocking, D., Ropes, M.W., Bauer, W.: Early joint lesions of rheumatoid arthritis. *Arch. Pathol.* 59, 129 (1955)
126. Lawrence, J.S., Ball, J.: Genetic studies on rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 17, 160 (1958)

127. Lawrence, J.S., Laine, V.A.J., DeGraaf, R.: The epidemiology of rheumatoid arthritis in Northern Europe. Proc. Soc. Med. 54, 454 (1961)
128. Lawrence, J.S., Wood, P.H.N.: Genetic influences in rheumatoid arthritis. In "Rheumatic Diseases". Pfizer Medical Monogr. 3, p 19 (1968)
129. Leventhal, B.G., Waldorf, D.S., Falal, N.: Impaired lymphocyte transformation and delayed hypersensitivity in Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest. 46, 1338 (1967)
130. Lloyd, T.M., Panush, R.S.: Cell-mediated immunity in rheumatoid arthritis. Impaired lymphocyte responsiveness, humoral immunosuppressants, and correlations with clinical status in patients off drug therapy. Journal of Rheumatology 4, 231 (1977)
131. McSween, R.N.M., Gondic, R.B., Anderson, J.R.: Occurrence of antibody to salivary duct epithelium in Sjögren's disease, rheumatoid arthritis, and other arthritides. A clinical and laboratory study. Ann. Rheum. Dis. 26, 402 (1967)
132. McKusick, V.A.: Mendelian inheritance in man. Baltimore, Johns Hopkins University Press. (1978)
133. McLenachan, J.: New aspects of the etiology of Sjögren's syndrome. Trans. Ophthal. Soc. UK. 76, 413 (1956)

134. McMichael, A.J., Sasazuki, T., McDevitt, H.O.: The immune response to diphtheria toxoid in humans. Transplant. Proc. Vo. IX, 1, Supplement 1, p 191 (1977)
135. McMichael, A.J., Sasazuki, T., McDevitt, H.O., Payne, R. O.: Increased frequency of HLA- Cw3 and HLA- Dw4 in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 20, 1037 (1977)
136. Mellors, R., Heimer, R., Corcos, J.: Cellular origin of rheumatoid factor. J. Exp. Med. 110, 875 (1959)
137. Melmon, K.L., Cline, J.J.: Kallikrein activator and kinase in human granulocytes: A model of inflammation. In: Rocha, E., Silva, M. (eds.): Symposium on vasoactive polypeptides: Bradykinin and kinins. Oxford, Pergamon Press (1976)
138. Menzel, J., Steffen, C., Kolarz, G., Kojer, M., Smolen, J.: Demonstration of anti-collagen antibodies in rheumatoid arthritis synovial fluids by 14 C Radioimmunoassay. Arthritis Rheum. 21, 243 (1978)
139. Mergenhagen, S.E., Wahl, S.M., Wahl, L.M., Horton, J.E., Raisz, L.G.: The role of lymphocytes and macrophages in the destruction of bone and collagen. Ann. N.Y. Acad. Sci. 256, 132 (1975)

140. Meyerowitz, S., Jacox, R.F., Hess, D.W.: Monozygotic twins discordant for rheumatoid arthritis: A genetic, clinical and psychological study of eight sets. *Arthritis Rheum.* 11, 1 (1968)
141. Miller, J.F.A.P., Mitchell, G.F.: Thymus and antigen reactive cells. *Transplant. Rev.* 1, 3 (1969)
142. Mitchell, N., Blackwell, R.: The electron microscopy of regenerating synovium after subtotal synovectomy in rabbits. *J. Bone Jr. Surg.* 50 A, 675 (1968)
143. Mizerski, J., Chartrand, S., Gajlpeczalska, K.: Con-A-induced suppressor cells in man. I. Induction and characterization of suppressor cells. *Immunobiol.* 158, 270 (1981)
144. Moutsopoulos, H.M., webber, B.L., Vlagopoulos, T.P.: Difference in the clinical manifestations of sicca syndrome in the presence and absence of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* 66, 733 (1979)
145. Müller-Eberhard, H.J., Bokisch, V.A., Budzko, D.B.: Studies of human anaphylatoxins and their physiological control mechanism. In "Immunopathology". Grune und Strotton, New York, p 191 (1970)

146. Multicentre Study Group: Levamisole in rheumatoid arthritis.
A randomised double-blind study comparing two dosage regimens of levamisole with placebo. *Lancet* 11, 1007 (1978)
147. Munro, A., Bright, S.: Products of the major histocompatibility complex and their relationship to the immune response. *Nature* 264, 145 (1967)
148. Munthe, E., Natvig, J.B.: Characterization of IgG complexes in eluates from rheumatoid tissue. *Clin. Exp. Immunol.* 9, 249 (1971)
149. Munthe, E., Natvig, J.B.: Complement- fixing intracellular complexes of IgG rheumatoid factor in rheumatoid plasma cells. *Scand. J. Immunol.* 1, 217 (1972)
150. Munthe, E., Natvig, J.B.: Immunoglobulin classes, subclasses and complexes of IgG rheumatoid factor in rheumatoid plasma cells. *Clin. Exp. Immunol.* 12, 55 (1972)
151. Nettelbladt, E., Sundblad, L.: Studies on serum haptoglobins in rheumatoid arthritis. *Opusc. med. (Stockh.)* 12, 223 (1967)
152. Netzel, B., Grosse-Wilde, H., Baumann, P., Mempel, W.: LD typing in man using cells frozen and stored in microtiter-plates. *Tis. Ant.* 6, 8 (1975)

153. Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20, 462 (1960)
154. Nyullassy, S., Ravingerova, G., Zvarova, E., Bue, M.: HL-A antigens in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1, 450 (1974)
155. O'Brien, W.M., Bennett, P.H., Burch, T.A., Bunim, J.J.: A genetic study of rheumatoid arthritis and rheumatoid factor in Blackfeet und Pima Indians. *Arthritis Rheum.* 10, 163 (1967)
156. Ohlson, K.: Leukocyte collagenase and elastase and their inhibitors. In: Talamo, R.C., Mangos, J.A. (eds.): *Fundamental problems of cystic fibrosis and related diseases. Symposia specialists, Miami, Fla.* p 173 (1973)
157. Ohlsson, K.: Granulocyte collagenase and elastase and their interaction with α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin. In: Reich, E., (ed.): *Protease and Biological Control. Cold Spring Harbor Laboratories*, pp 591, 602 (1975)
158. Ohno, O., Cooke, T.D.: Electronmicroscopy morphology of immunoglobulin aggregates and their interactions in rheumatoid articular collagenous tissues. *Arthritis Rheum.* 21, 516 (1978)

159. Panayi, G.S., Wooley, P.H., Batchelor, J.R.: HLA-DRw4 and rheumatoid arthritis. *Lancet* 1, 730 (1979)
160. Panayi, G.S., Wooley, P.H.: B-lymphocyte allatigens in the study of the genetic basis of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 36, 365 (1977)
161. Panush, R.: Non-speutic suppressorfuntion in rheumatoid arthritis. *I. Clin. Lab. Immunol.* 9, 59 (1982)
162. Paulus, H.E., Machleder, H.I., Bangert, R., Stratton, J. A., Goldberg, L., Whitehouse, M., YU, D.T.Y., Pearson, C.M.: A case report. Thoracic duct lymphocyte drainage in rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1, 173 (1973)
163. Pavlidis, N.A., Karsh, J., Moutsopoulos, H.M.: The clinical picture of primary Sjögren's syndrome: A retrospective study. *J. Rheumatol.* 9, 685 (1982)
164. Pearson, C.M.: Transfer of adjuvant arthritis by means of lymph node or spleen cells. *J. Belg. Rheumatol. Med. Phys.* 24, 150 (1969)
165. Peavy, D.L., Pierce, C.W.: Cell-mediated immune responses in vitro. I. Suppression of the generation of cytotoxic lymphocytes by Concanavalin A and Concanavalin A-activated spleen cells. *J. Exp. Med.* 140, 356 (1974)

166. Pellegrino, M.A., Ferrone, S., Safford, J.W., Hirata, A.A., Terasaki, P.I., Reisfeld, R.A.: Stimulation of lymphocyte transformation by streptococcal type M 1 protein: Relationship to HL-A antigens. *J. Immun.* 109, 97 (1972)
167. Percy, J.S., Davis, P., Russell, A.S., Brisson, E.: A longitudinal study in vitro tests for lymphocyte function in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 37, 416 (1978)
168. Person, D.A., Rawls, W.E., Sharp, J.T.: Replication of Rubella, Newcastle disease and vesicular stomatitis viruses in cultured rheumatoid synovial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138, 748 (1971)
169. Poliverini, P.J., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A., Jr., Unanue, E.R.: Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269, 804 (1977)
170. Pope, R.M.: Rheumatoid arthritis associated with hyperviscosity syndrome and intermediate complex formation. *Arch. Intern. Med.* 135, 281 (1975)
171. Pope, R.M., Teller, D.C., Mannik, M.: The molecular basis of self-association of antibodies to IgG (rheumatoid factor) in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 517 (1974)

172. Ramm, B., Hofmann, G.: Biomathematik und medizinische Statistik. Enke Verlag, Stuttgart, S. 305 (1976)
173. Rich, R.R., Pierce, C.W.: Biological expressions of lymphocyte activation. I. Effects of phytomitogens on antibody synthesis in vitro. J. Exp. Med. 137, 205 (1973)
174. Rich, R.R., Pierce, C.W.: Biological expressions of lymphocyte activation. II. Generation of a population of thymus-derived suppressor lymphocytes. J. Exp. Med. 137, 649 (1973)
175. Rich, R.R., Rich, S.S.: Biological expressions of lymphocyte activation. IV. Concanavalin A-activated suppressor cells in mouse Mixed Lymphocyte Reactions. J. Immun. 114, 1112 (1975)
176. Rodman, W.S., Williams, R.C., Jr., Bilka, P.J., Müller-Eberhard, H.J.: Immunofluorescent localization of the third and fourth component of complement in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. J. Lab. Clin. Med. 69, 141 (1967)
177. Roitt, I.M., Corbett, M., Festenstein, H., Jaraquemada, D., Papasteriadis, C., Hay, F.C., Nineham, L.J.: HLA-DR μ 4 and the prognosis in rheumatoid arthritis. Lancet 1, 990 (1978)

178. Ropes, M.W., Bennet, G.A., Cobb, S., Jacox, R., Jessar, R.A.: Revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. Bull. Rheum. Dis. 9, 175 (1958)
179. Rosenthal, A.S., Shevach, E.M.: Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T-lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. J. Exp. Med. 138, 1194 (1973)
180. Ruckdeschel, J.C., Graziano, K.D., Mardiney, M.R.: Additional evidence that the cell-associated immune system is the primary host defense against measles (rubeola). Cell. Immunol. 17, 11 (1975)
181. Ruddy, S., Colten, H.R.: Biosynthesis of complement proteins by synovial tissues. N. Engl. J. Med. 290, 1284 (1974)
182. Russel, A.S., Edelman, J.: The role of laboratory in rheumatology. 6. Lymphocytes. Clin. Rheum. Dis. 9/1, 117 (1983)
183. Ryder, L.P., Svejgaard: Association between HLA and disease. State Univ. Hosp. (1976)
184. Sakane, T., Green, I.: Protein A from Staphylococcus aureus - a mitogen for human T-lymphocytes and B-lymphocytes but not L-lymphocytes. J. Immun. 120, 302 (1978)

185. Sakane, T., Taniguchi, Y., Honda, M., Kotani, H.:
Suppressor T-cell activity in rheumatoid arthritis and
systemic lupus erythematosus. *Ryumachi* 21, 115 (1981)
186. Sakane, T., Takada, S., Murakawa, J., Kotani, H., Honda,
M., Ueda, J.: Analysis of suppressor T-cell function in
patients with rheumatoid arthritis: Defects in production
of and responsiveness to Concanavalin A - induced Suppress-
sor T-cell. *J. Imm.* 129/5, 1972 (1982)
187. Sandritter, W., Benecke, G.: Abwehrmechanismen des Orga-
nismus. In: Sandritter, Beneke (Hrsg.), *Allgemeine Patho-
logie*. Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 476 (1974)
188. Sandson, J., Hamerman, D.: Binding of an alpha globulin
to hyaluronateprotein in pathological synovial fluids.
Science 146, 70 (1964)
189. Sapolsky, A.I., Keiser, H.D., Howell, D.S., Woessner, J.
F., Jr.: Metalloproteases of human articular cartilage
that digest cartilage proteoglycan at neutral and acid pH
J. Clin. Invest. 58, 1030 (1976)
190. Sharon, N., Lis, H.: Lectins: Cell-agglutination and su-
garspecific proteins. *Science* 177, 949 (1972)
191. Shearn, M.A.: Sjögren's syndrome. Philadelphia, W.B. Saun-
ders, 1971

192. Shou, L., Schwartz, S.A., Good, R.A.: Suppressor cell activity after Concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. *J. Exp. Med.* 143, 1100 (1976)
193. Sjögren, H.: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis filiformis bei Hypofunktionen der Tränendrüsen) *Acta. Ophthal. Suppl.* 2, 11, 1 (1933)
194. Sjögren, H.: Keratoconjunctivitis sicca. In: Ridley, F., Sorsby, A. (eds.). *Modern trends in ophthalmology.* Butterworth & Co., Ltd., London (1940)
195. Sluvin, S., Strobers, S.: In vitro T-cell mediated function in Patients with active rheumatoid arthritis. *Ann. Rheuma Dis.* 40, 60 (1981)
196. Smith, K.A., Chess, L., Mardiney, M.R.: The relationship between rubella hemagglutination inhibition antibody (HIA) and rubella induced in vitro lymphocyte tritiated thymidine incorporation. *Cell. Immunol.* 8, 321 (1973)
197. Söberg, M., Bendixen G: Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity. *Acta. Med. Scand.* 181, 247 (1967)
198. Söberg, M., Bertram, U: Cellular hypersensitivity in Sjögren's syndrome. *Acta. Med. Scand.* 184, 319 (1968)

199. Sokoloff, L.: The pathology of rheumatoid arthritis and allied disorders. In "Arthritis and Allied Conditions." Lea und Febiger, Philadelphia, 309 (1972)
200. Stafford, Ch., Niedermeier, W., Holley, H.L., Pigman, W.: Studies on the concentration and intrinsic viscosity of hyaluronic acid in synovial fluids of patients with rheumatic diseases. Ann. Rheum. Dis. 23, 1526 (1964)
201. Stastny, P.: Association of the B-cell alloantigen DR W4 with rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med. 298, 869 (1978)
202. Stastny, P.: Mixed lymphocyte culture typing cells from patients with rheumatoid arthritis. Tissue Antigens 4, 1148 (1974)
203. Stastny, P., Fink, C.W.: HLA-Dw4 in adult and juvenile rheumatoid arthritis. Transplant. Proc. 9, 1863 (1977)
204. Steinberg, A.D., Klassen, L.W.: Role of suppressor T-cells in lymphopietic disorders. Clin. Haematol. 6, 439 (1977)
205. Stenstam, T.: On the occurence of keratoconjunctivitis sicca in cases of rheumatoid arthritis. Acta. Med. Scand. 127, 130 (1947)
206. Steven, F.S.: Evidence for a deficiency in intramolecular crosslinking in collagen fibrils isolated from rheumatoid joints. Ann. Rheum. Dis. 25, 563 (1966)

207. Stewart, S.M., Alexander, W.R.M., Duthie, J.J.R.:
Isolation of diptheroid bacilli from synovial membrane
and fluid in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 23,
477 (1969)
208. Stoltze, C.A., Hanlon, D.G., Pease, G.L.: Keratocon-
junctivitis sicca and Sjögren's syndrome. Systemic mani-
festations and hematologic and protein abnormalities. *Arch.*
Intern. Med. 106, 513 (1960)
209. Symposium on cellular and soluble factors in the regula-
tion of lymphocyte activation. *Fed. Proc.* 35, 2044 (1975)
210. Szenberg, A., Warner, N.L.: Immunological function of
thymus and bursa of Fabricius. Dissociation of immunolo-
gical responsiveness in fowls with a **hormonally** arrested
development of lymphoid tissues. *Nature* 194, 146 (1962)
211. Tada, T., Tanaguchi, M., David, C.S.: Suppressive and
enhancing T-cell factors as I-region gene products. Pro-
perties and the subregion assignment. Origins of lympho-
cyte diversity, *XLI Cold Spring Harbor Symposia on Quan-*
titative Biology 41, 119 (1977)
212. Terasaki, P.I., McClelland, I.D.: Microdroplet assay of
human serum cytotoxins. *Nature* 204, 998 (1964)
213. Thompson, M., Eadie, S.: Keratoconjunctivitis sicca and
rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 15, 21 (1956)

214. Tomar, R.H., Taylor, F.B., Green, G.R.: Delayed hypersensitivity to SK-SD: In vitro lymphocyte study with an active component. J. Immun. 108, 231 (1972)
215. Tosato, G., Steinberg, A.D., Blaese, R.M.: Defective EBV-specific suppressor T-cell function in rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med. 19, 238 (1981)
216. Traycoff, R.B., Pascual, E., Schumacher, H.R., Jr.: Mononuclear cells in human synovial fluid. Identification of lymphoblasts in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 19, 743 (1976)
217. Trentnam, D.E., Lynessius, R.A., Rocklin, R.E., David, J. R.: Cellular sensitivity to collagen in rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med. 299, 327 (1978)
218. Unterrichtung durch die Bundesregierung: Bericht über Maßnahmen zur Rheumabekämpfung. Drucksache 8/3625 (1980)
219. Van Bozel, J.A., Ragot, S.A.: Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes. N. Engl. J. Med. 293, (1975)
220. Van de Putte, L.B.A., Hegt, V.N., Overbeek, T.E.: Activators and inhibitors of fibrinolysis in rheumatoid and non-rheumatoid synovial membranes. Arthritis Rheum. 20, 671 (1977)

221. Vanselow, N.A., Dodson, V.N., Angeli, D.C.: A clinical study of Sjögren's syndrome. *Ann Intern. Med.* 58, 124 (1963)
222. Vasalli, J.D., Reich, E.: Macrophage plasminogen activator: Induction by products of activated lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 145, 427 (1977)
223. Vogelsang, H., Hein, G., Jäger, L.: Untersuchungen zur Suppressorzellaktivität bei rheumatoider Arthritis. *Z. Rheumatol.* 39, 141 (1980)
224. Vogelsang, H., Hein, G., Jäger, L.: Con-A- induzierbare Suppressoraktivität bei rheumatoider Arthritis. *Z. Rheumatol.* 41, 160 (1982)
225. Wahl, L.M., Wahl, S.M., Mergenhagen, S.E., Martin, G.R.: Collagenase production by lymphokine-activated macrophages. *Science* 187, 251 (1975)
226. Waksman, B.H., Namba, Y.: On soluble mediators of immunologic regulation. *Cell. Immunol.* 21, 161 (1976)
227. Waldmann, R.A., Broder, S.: Suppressor cells in the regulation of the immune response. In: Schwartz, R.S. (ed.). *Progress in clinical immunology*. Vol. 3. Grune & Stratton, New York, p 155 (1977)

228. Waldmann, T.A., Broder, S., Durm, M., Goldman, C., Muul, L.: Defects in immunoregulatory cell interactions in patients with immune dysfunction. *Prog. Immunol.* 3. 635, (1977)
229. Ward, P.A., Zwaifler, N.J.: Complement-derived leukoactive factors in inflammatory synovial fluids of humans. *J. Clin. Invest.* 50, 606 (1971)
230. Waxman, J., Lickshin, M.D., Schnapp, J.J., Doneson, I.N.: Cellular immunity in rheumatic diseases. I. Rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism.* 16, 499 (1973)
231. Wegelius, O., Laine, V., Lindström, B., Klockars, M.: Fistula of the thoracic duct as immunosuppressive treatment in rheumatoid arthritis. *Acta. Medica. Scand.* 187, 539 (1970)
232. Weisman, M., Zwaifler, N.: Cryoglobulinemia in rheumatoid arthritis. Significance in serum of patients with rheumatoid vasculitis. *J. Clin. Invest.* 56, 725 (1975)
233. Werb, Z., Aggeler, J.: Proteases induce secretion of collagenase and plasminogen activator by fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1839 (1978)
234. Whitehouse, M.W., Whitehorse, D.J., Pearson, C.M.: Passive transfer of adjuvant-induced arthritis and allergic encephalomyelitis in rats using thoracic duct lymphocytes. *Nature* 224, 1322 (1969)

235. Williams, R.M., Benacerraf, B.: Genetic control of thymus-derived cell function. I. In vitro DNA synthetic response of normal mouse spleen cells stimulated by the mitogens Concanavalin A and Phytohemagglutinin. J. Exp. Med. 135, 1279 (1972)
236. Winchester, R.J., Kunkel, H.G., Agnello, V.: Occurrence of gammaglobulin complexes in serum and in joint fluid of rheumatoid arthritis patients. J. Exp. Med. 134, 286 (1971)
237. Woolf, B.: On estimating the relation between blood groups and disease. Ann. Hum. Genet. 19, 251 (1955)
238. Woolley, D.E., Crossley, M.J., Evanson, J.M.: Collagenase at sites of cartilage erosion in the rheumatoid joints. Arthritis Rheum. 20, 1231 (1977)
239. Woolley, D.E., Roberts, D.R., Evanson, J.M.: Small weight B_1 -serum protein which specifically inhibits human collagenase. Nature 261, 325 (1976)
240. Ziff, M., Schmid, F.R., Lewis, A.J., Tanner, M.: Familial occurrence of the rheumatoid factor. Arthritis Rheum. 1, 392 (1958)
241. Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C.: Activity of sensitized thymus derived lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis reflects immunological surveillance against self components. Nature 251, 547 (1974)

242. Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C.: Restriction of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenetic or allogenetetic system. Nature 248, 701 (1974)
243. Zvaifler, N.J.: Immunoreactant in rheumatoid synovial effusions. J. Exp. Med. 134, 276 (1971)
244. Zvaifler, N.J.: Immunopathology of joint inflammation in arthritis. Adv. Immunol. 16, 265 (1973)

Herrn Prof. Dr. Mempel und Herrn Prof. Dr. Schattenkirchner danke ich für die Überlassung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, die Einrichtungen der medizinischen Poliklinik und des Transfusionszentrums der Medizinischen Klinik III zu benutzen.

Bei der Durchführung leistete mir Herr Dr. med. R. Eckstein von der Medizinischen Klinik III, Transfusionszentrum, Klinikum Großhadern, Beistand. Seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und freundliche Kritik erleichterten mir wesentlich die Einarbeitung und Durchführung der Thematik.

Für die Unterstützung bei der medizinisch-technischen Durchführung der Arbeit danke ich insbesondere den Mitarbeiterinnen des Transfusionszentrums der Medizinischen Klinik III Fräulein Angela Lehmeier, Ursula Mangold, Andrea Obkircher, Ingrid Otto und Annette Schleifer.

Für die gewissenhafte Erstellung des Manuskripts danke ich besonders herzlich Frau Claudia Knoll, Gestratz.

LEBENS LAUF

Name	Manfred Riester
Geburtstag und -ort	18. Mai 1957 in Lindenberg
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Eltern	Helmut Riester, Studien- direktor Agnes Riester, Hausfrau
Schulbildung	1963-1967 Volksschule Linden- berg 1967-1976 Gymnasium Lindenberg 1976 Abitur
Bundeswehr	1976-1978
Zahnmedizinstudium	ab November 1978 an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorphysikum	1979
Physikum	1981
Staatsexamen	1984
Assistentenzeit	seit September 1984 in freier Praxis in Weiler/Allgäu

